

**CDNA-KLONIERUNG UND AUFKLÄRUNG
DER VOLLSTÄNDIGEN PRIMÄRSTRUKTUR
DER ENZYMATISCH AKTIVEN, KLEINEN
UNTEREINHEIT VON HUMANER
CARBOXYPEPTIDASE N**

Matthias Schube

Disbui. München

1988

CDNA-KLONIERUNG UND AUFKLÄRUNG
DER VOLLSTÄNDIGEN PRIMARSTRUKTUR
DER ENZYMATISCH AKTIVEN, KLEINEN
UNTEREINHEIT VON HUMANER
CARBOXYPEPTIDASE N

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Matthias Schube

1988

1. Berichterstatter:..... Prof. Dr. H. Fritz
2. Berichterstatter:..... Prof. Dr. G. Hartmann
Tag der mündlichen Prüfung:..... 26. August 1988

Herrn Prof. Dr. H. Fritz danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes sowie für seinen wertvollen Rat und stete Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. G. Hartmann danke ich für die Betreuung seitens der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Herrn Dr. W. Gebhard sowie den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Frau G. Leysath (Protein- und Antikörperisolierungen) und Frl. G. Zuckriegl (DNA-Sequenzierung und Oligonukleotidsynthese), danke ich für anregende Diskussion und praktische Unterstützung.

Herrn PD Dr. M. Eulitz (Institut für Hämatologie der GSF, Abteilung für Immunologie, München) danke ich für die Durchführung der Aminosäuresequenzierung.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0117

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	2
3.	MATERIAL UND METHODEN	5
3.1.	Material	5
3.2.	Methoden	7
	Durchmustern der humanen Leber-cDNA-Genbank.....	7
	Isolierung und Charakterisierung rekombinanter	
	Phagen- und Plasmid-DNA	8
	Subklonierung von cDNA in Plasmide	9
	"Southern-Blot" und Hybridisierung von cDNA mit radio-	
	aktiv markierten Sonden	9
	DNA-Sequenzierung	10
	Immunologische Untersuchungen von Fusionsproteinen sowie	
	von Carboxypeptidase N und H-Kininogen	12
4.	ERGEBNISSE	14
	Durchmustern der cDNA-Expressionsbibliothek mit Anti-	
	Carboxypeptidase N-Antikörpern und Charakterisierung der	
	gefundenen Klone	14
	Spezifitätsuntersuchung der Carboxypeptidase N-	
	Antikörper.....	29
	Isolierung und Charakterisierung eines cDNA-Klones für	
	Carboxypeptidase N	35
5.	DISKUSSION	41
6.	LITERATUR	51
7.	ABKÜRZUNGEN	57

1. Zusammenfassung

Humane Carboxypeptidase N (EC 3.4.17.3.), bestehend aus zwei großen Untereinheiten von je 83 kD und zwei kleinen Untereinheiten von je 45 kD, katalysiert die C-terminale Abspaltung von Lysin- oder Argininresten aus Proteinen und Peptiden. Diese im Blut gefundene Metalloprotease ist bei der Regulation vieler biochemischer Vorgänge beteiligt (Kinin- und Komplementsystem, Blutgerinnungskaskade, Peptidhormonspiegel).

Zur Aufklärung der molekularen Struktur wurde die cDNA der kleinen, enzymatisch aktiven Untereinheit kloniert, sequenziert und die Aminosäuresequenz abgeleitet. Der die vollständige cDNA enthaltende Klon wurde mittels Plaquehybridisierung aus einer humanen Leber-cDNA-Genbank isoliert. Die Nukleinsäuresequenz der Sonde war aus der N-terminalen Aminosäuresequenz abgeleitet worden. Bei einem vorhergehenden Versuch, Carboxypeptidase N-Klone durch den immunologischen Nachweis von Fusionsproteinen zu erhalten, wurden vier Klone isoliert. Zwei kodierten für einen Abschnitt der schweren Kette des H-Kininogens. Die von den beiden anderen Klonen kodierten Proteine konnten bisher nicht zugeordnet werden. Es bleibt zu klären, ob einer von ihnen für die große Untereinheit von Carboxypeptidase N kodiert.

Die cDNA der kleinen Untereinheit ist 1.700 Bp lang, wobei der kodierende Bereich 458 Aminosäuren einschließlich der Signalsequenz (20 Aminosäuren) umfaßt. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit der von Carboxypeptidase E aus Rind ist mit 49 % recht hoch. Zusätzlich können viele Aminosäureunterschiede als konservative Aminosäureaustausche interpretiert werden. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von Carboxypeptidase N zu der von Carboxypeptidase A oder B beschränkt sich hauptsächlich auf die funktionell wichtigen Aminosäuren. Vermutlich entwickelten sich die Carboxypeptidasen aus einer gemeinsamen Vorläuferform, wobei strukturelle Unterschiede verschiedener Gruppen wohl aufgrund ihrer unterschiedlichen Aufgaben und Wirkorte ausgebildet wurden.

2. EINLEITUNG

Gezielte limitierte Proteolyse von Schlüsselproteinen einer Vielzahl biochemischer Prozesse wird in seiner Bedeutung als Steuerungsmechanismus zunehmend erkannt und untersucht. Sie kann über die Aktivierung von Proenzymen durch gezielte Abspaltung sogenannter Aktivierungspeptide Stoffwechselwege beschleunigen oder anwerfen. In den Kaskadensystemen des Blutes ist dieses Prinzip äußerst wirksam verwirklicht. Offensichtlich findet es auch Anwendung bei der Regulation bereits aktivierter Wege des Stoffwechselgeschehens. Beispielsweise lassen sich viele biologisch aktive Peptide durch Abspaltung einer C-terminalen, basischen Aminosäure in ihrer Wirkung verändern oder gänzlich abschalten.

Ein im menschlichen Plasma vorkommendes Enzym, das die Abspaltung von Lysin- oder Argininresten katalysiert, ist Carboxypeptidase N (Arginin-Carboxypeptidase, EC 3.4.17.3; Erdös & Sloane, 1962). Das gefundene Molekulargewicht liegt zwischen 280.000 und 320.000, wobei sich je zwei immunologisch unterscheidbare Untereinheiten vom Molekulargewicht 83.000-98.000 und 42.000-55.000 zu einer tetrameren Struktur des reifen Komplexes zusammenlagern (Oshima et al., 1974 und 1975, Plummer & Hurwitz, 1978 und Levin et al., 1982). Nur die kleine, unglykosylierte Untereinheit ist enzymatisch aktiv. Sie soll durch Proteasen (Trypsin, Plasmin, Plasmakallikrein) unter Verlust an Stabilität in kleinere, noch aktivere Fragmente (MG 29.000 und kleiner) zu spalten sein (Levin et al., 1982). Doch wurde nie gezeigt, daß isolierte Fragmente diese Aktivität aufweisen. Die große Untereinheit dient offenbar zur Stabilisierung des Enzyms im Blut und besitzt einen Kohlenhydratanteil (Plummer & Hurwitz, 1978).

Die Hauptaufgabe von Carboxypeptidase N wurde in der Inaktivierung des Bradykinins gesehen, weshalb sie auch als Kininase I

bezeichnet wurde (Erdös & Sloane, 1962). Außer den Kininen, die gefäßerweiternd wirken und die Gefäßpermeabilität erhöhen, sind auch die Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a durch Carboxypeptidase N (daher auch der Name Anaphylatoxin-Inaktivator) in ihrer Wirkung regulierbar (Bokisch & Müller-Eberhard, 1970). Sie werden aus den Proteinen C3, C4 und C5 des aktivierten Komplementsystems freigesetzt und bewirken die Ausschüttung von Histamin aus Mastzellen, von hydrolytischen Enzymen aus Neutrophilen, sowie eine Kontraktion der glatten Muskulatur und einen Anstieg der Gefäßpermeabilität (Rother U. und K., 1984). C3a und C4a sind dabei weit weniger wirksam als C5a, das zusätzlich noch chemotaktisch auf polymorphkernige Leukozyten und Monozyten wirkt. Carboxypeptidase N bewirkt bei diesen Anaphylatoxinen den Verlust der mastzelldegranulierenden Aktivität, während die chemotaktische Wirkung im Des-Arg-C5a noch erhalten bleibt. Ähnlich können verschiedene Fibrin(ogen)spaltprodukte mit gefäßpermeabilitätserhöhender Wirkung durch Carboxypeptidase N inaktiviert werden (Belew et al., 1980).

Besonders bei schweren Entzündungen treten die genannten biologisch aktiven Peptide in erhöhten Konzentrationen auf. Carboxypeptidase N spielt bei der Inaktivierung bzw. bei der Anpassung der Wirkung dieser Peptide an die pathophysiologische Situation im Blut eine wichtige Rolle und vermittelt einen entzündungshemmenden Einfluß (Rybák, 1978).

Darüber hinaus sind auch Arg*- und Lys*-Enkephaline gute Substrate für Carboxypeptidase N. Unter bestimmten Bedingungen werden sie sogar schneller als C3a und Bradykinin umgesetzt, weshalb die Beteiligung der Carboxypeptidase N an der Regulation des Peptidhormonspiegels, zumindest im Plasma, diskutiert wird (Skidgel et al., 1984). Diese war bisher im wesentlichen der Enkephalinkonvertase (Carboxypeptidase E) zugeschrieben worden. Nach dem bisherigen Kenntnisstand unterscheiden sich Carboxypeptidase N und Carboxypeptidase E eindeutig hinsichtlich

Molekülmasse und Wirkort. Während humane Carboxypeptidase N als permanent aktives und durch die große Untereinheit vor Proteolyse geschütztes Enzym im Serum vorkommt, findet man Carboxypeptidase E als Speicherprotein mit Aktivierungspeptid im Nebennierenmark und in der Hypophyse des Rindes (Fricker & Snyder, 1983, Fricker et al., 1986). Strukturelle Unterschiede mögen durch die unterschiedlichen Erfordernisse am jeweiligen Wirkort bedingt sein. Bei dem Vergleich der beiden pankreatischen Verdauungsenzyme Carboxypeptidase A (Quijcho & Lipscomb, 1971) und B (Folk et al., 1960) mit Carboxypeptidase E findet man Übereinstimmungen in der Primärstruktur nur in den mechanistisch wichtigen Abschnitten (Fricker et al., 1986). Um mögliche Zusammenhänge zwischen Struktur, Funktion und Wirkort der bisher bekannten Carboxypeptidasen aufzuzeigen (zum Beispiel der Carboxypeptidase N, der humanen Carboxypeptidase aus Urin, Skidgel et al. 1984b; der bovinen Carboxypeptidase aus Lysosomen, Lipperheide & Otto, 1986; der humanen membrangebundenen Carboxypeptidase aus Plazenta, Niere und Lunge, Skidgel et al., 1984a), ist die Aufklärung ihrer Primärstruktur Voraussetzung.

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Primärstruktur der enzymatisch aktiven Untereinheit von Carboxypeptidase N. Dazu sollten Carboxypeptidase N-Gene, insbesondere das für die kleine Untereinheit kodierende Gen, kloniert, die Aminosäuresequenz aus der cDNA-Sequenz abgeleitet und mit der bekannter Carboxypeptidasen verglichen werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. MATERIAL

Geräte:

Die Flachgelelektrophoresegeräte für Agarosegele stammten von BRL, Karlsruhe und Pharmacia, Freiburg, die Sequenzgelapparaturen von Renner, Dannstadt. Von Schleicher & Schuell, Dassel, war die "Biotrap"-Apparatur, von Biometra, Göttingen die "Fast Blot"-Apparatur, von BRL, Karlsruhe, die "Hybri-Slot™ Manifold"-Apparatur und von Bachofer, Reutlingen, der Hybridisierungssofen.

Verwendete Substanzen und Materialien:

Restriktionsenzyme und einige andere Enzyme wie DNA-Polymerase I (Klenow- bzw. Kornberg-Enzym), RNase A und T4 DNA Ligase kamen von Boehringer, Mannheim, teilweise aber auch von New England Biolabs, Schwalbach, (Restriktionsenzyme), Pharmacia, Freiburg (DNA-Polymerase I, Klenow) oder BRL, Karlsruhe (RNase T1). Von Sigma, Taufkirchen, wurde Isopropyl- β -D-thio-galaktopyranosid (IPTG), Nitro blue tetrazolium (NBT), Rinderserumalbumin (Frakt. V) und 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal), von Pharmacia, Freiburg, Desoxy- und Didesoxynukleosidtriphosphate, E. coli DNA, "M13 Reverse Sequencing Primer" und das Oligolabeling™ Kit bezogen. Die Desoxy- und Didesoxynukleosidtriphosphate stammten teilweise auch von Boehringer, Mannheim. Amersham Buchler, Braunschweig, lieferte die radioaktiven Nukleotide ((γ - 32 P)ATP, (α - 32 P)dATP, (α - 32 P)dCTP und (α - 35 S)dATP). Weiterhin wurden verwendet: Ampicillin von Hoechst, 5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphat (BCIP) und Chloramphenicol von Boehringer, Mannheim, Bacto-Agar und Bacto-Trypton von Difco, Detroit, Ethidiumbromid von Serva, Heidelberg, H-Kininogen von Protogen, Läufelfingen, Anti-Human-Kininogen-IgG (Antiserum jeweils gegen die H- und gegen die L-Kette) von ICN Biomedicals, Eschwege, sowie der "T7-Promotor Primer" und das ProtoBlot™ immunoscreening system (beide Promega

Biotec). Für Hybridisierungen und immunologische Untersuchungen wurden Membranfilter aus Nitrocellulose (BA 85, 0.45 μ m, Rundfilter $\varnothing$ 82 und 137 mm sowie Rollenware von Schleicher & Schuell, Dassel) oder aus Nylon (GeneScreen™ Filter von NEN, Dreieich) eingesetzt. Die Behandlung der Glasplatten für die Sequenzgelelektrophoresen erfolgte mit "BindSilan" bzw. mit "RepelSilan" (LKB, Gräfelfing). Die Filme lieferten Polaroid, Cambridge, USA (Sofortbildfilme Typ 667 und Typ 57) und Kodak, Rochester, USA (Röntgenfilme X-Omat-S und X-Omat-AR), die Verstärkerfolien kamen von DuPont, Wilmington. Nensorb™ 20 Säulen (NEN, Dreieich), "NAP-10", Sephacryl® S-300 und Nick™-Säulen (Pharmacia, Freiburg) sowie Hydroxylapatit (Bio-Gel® HTP von Bio Rad, München) wurden zur DNA-Reinigung, Sephacryl® S-300 (Pharmacia, Freiburg) zur Gelchromatographie verwendet. Alle anderen Chemikalien von analytischer Reinheit stammten von der Firma Merck, Darmstadt oder Firma Sigma, Taufkirchen. Die humane Leber-cDNA-Genbank in Lambda gt 11 wurde uns freundlicherweise von S.L.C. Woo, Houston, Texas zur Verfügung gestellt. Der Wirtstamm E. coli Y1090 r⁻ (BNN 96 hflA150 [chr::Tn10]) stammte von der Fa. Promega Biotec; für die Umklonierungen wurde das Plasmid pTZ 18R von Pharmacia (Freiburg) und kompetente Zellen (DH5-Zellen: end A1, hsd R17 (rk⁻, nk⁻), sup E44, thi-1, lambda⁻, recA1 gyrA96, relA1, Δ (lac), (F', proAB, lacI⁻Z Δ M15, Tn10(Z^r)) von BRL (Karlsruhe) verwendet.

Verwendete Puffer und Medien:

100 x Denhard (2 % BSA, 2 % Ficoll, 2 % Polyvinylpyrrolidon); Ligase-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 600 μ M ATP); Phagenverdünnungspuffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂); SSC (150 mM NaCl, 15 mM Na-citrat, pH 7.2); SSCP (120 mM NaCl, 15 mM Na-citrat, 13 mM KH₂PO₄, pH 7.2); 2x SST (300 mM NaCl, 30 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM EDTA); TBE' (900 mM Tris/HCl, pH 7.5 - 7.8, 25 mM EDTA, 900 mM Borsäure); TE (10 mM Tris/HCl, pH nach Vorschrift, 1 mM EDTA); TNE (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA); LB_o (10 g/l Bactotrypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt); LA (LB_o, 1,25 % Agar); LA/Amp. (LA, 100 μ g/ml Ampicillin) Weichagarose (LB_o, 0,7 % Agarose).

3.2. METHODEN

Durchmustern der humanen Leber-cDNA-Genbank

Zur Isolierung von Carboxypeptidase N-cDNA-Klonen wurde eine in den Bakteriophagen Lambda gt11 klonierte humane Leber-cDNA-Genbank verwendet, deren Konstruktion im Detail bei Kwok et al. (1985) beschrieben ist. Die Bank wurde nach der Methode von Young & Davis (1983) unter Verwendung des alkalischen-Phosphatase-Systems (ProtoBlot™ immunoscreening system) durchgemustert. Die Phagendichte betrug etwa 11.000 pfu (plaque forming units) pro Platte (Ø 9 cm). Polyklonale Antikörper gegen Carboxypeptidase N aus Kaninchen (10 mg/ml) standen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung und wurden in einer Verdünnung von 1 : 15.000 eingesetzt. Diese Konzentration hatte sich bei Vorversuchen in Bezug auf das Signal/Untergrund-Verhältnis als geeignet erwiesen. Der zweite Antikörper, ein mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Anti-Kaninchen-IgG, wurde 1 : 7.500 verdünnt. Positive Klone konnten nach der Färbereaktion als purpurrote Flecke nachgewiesen werden.

Für das Sichten der cDNA-Genbank mit Hilfe der Plaque-Hybridisierungsmethode (Benton & Davis, 1977) wurde eine 59 Basen lange Sonde mit T4-Polynukleotidkinase und (γ - 32 P)ATP radioaktiv markiert (Richardson, 1968). Die spezifische Aktivität betrug $1 - 8 \times 10^7$ cpm/ μ g DNA (Cerenkov-Zählung). Die Sonde war nach Isolierung von Carboxypeptidase N und daraus ihrer kleinen Untereinheit (W. Gebhard), Bestimmung der N-terminalen Sequenz der kleinen Untereinheit von Carboxypeptidase N (M. Eulitz) und nach geeigneter Codonauswahl (siehe Diskussion) nach der Phosphoramidit-Methode (Beaucage & Caruthers, 1981) am Gene Assembler (Pharmacia) synthetisiert worden. Die Aufreinigung der Sonde erfolgte mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (20 %) und anschließender Gel-Chromatographie der eluierten DNA an einer "NAP-10"-Säule.

10 Platten ($\varnothing$ 137 mm, Phagendichte etwa 10.000 pfu) wurden bei 37°C über Nacht inkubiert und die Phagen anschließend auf Nitrocellulosefilter übertragen (Auflegen der Filter auf die Platten für mindestens 1 Minute). Nach Denaturierung (20 Sek. 0,1 N NaOH, 1,5 M NaCl) und Neutralisation (20 Sek. 0,2 M Tris pH 7,5 und 20 Sek. 2 x SSCP) erfolgte die Fixierung der DNA bei 80°C im Vakuumofen (2 h). Die Vorhybridisierung wurde bei 68°C durchgeführt (1 h in 3 x SSC, 3 x Denhard und 1 h in 3 x SSC, 3x Denhard, 0,1% SDS, 100 µg/ml Lachs-DNA). Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde (10⁶ cpm/ml) wurde zuerst 1 h bei 68°C und anschließend mit einem fallenden Temperaturgradienten von 68°C bis 37°C hybridisiert. Es folgten drei Waschgänge bei Raumtemperatur: 1 h mit 3 x SSC, 3 x Denhard, 0,1 % SDS und 2 x 0,5 h in 3 x SSC, 0,1 % SDS. Nach dem Trocknen der Filter wurde über Nacht exponiert (X-Omat-AR, mit Verstärkerfolie).

Isolierung und Charakterisierung rekombinanter Phagen- und Plasmid-DNA

Die Präparation von Lambda-DNA erfolgte nach einer Standardmethode (Maniatis et al., 1982), die anschließende Reinigung der DNA mittels Hydroxylapatit-Chromatographie (Ivanov & Gigova, 1985). Phosphat wurde aus der Präparation durch Chromatographie an Nensorb™-20 Säulen entfernt. Die mit Methanol/H₂O (1:1) eluierte DNA wurde anschließend lyophilisiert und in Puffer (1x TE) gelöst.

Die Plasmidpräparationen für alle Versuche einschließlich der Sequenzierungsexperimente wurden nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt ("Guidelines for quick and simple plasmid sequencing" von Boehringer Mannheim, 1986). Die Analyse von Phagen- und Plasmid-DNA bzw. den Restriktionsfragmenten (Restriktionsspaltungen nach Maniatis et al., 1982) erfolgte mittels Agaroseflachgelelektrophorese (Phagen-DNA: 0,5% Agarose; Plasmid-DNA: 1,5% Agarose; Maniatis et al., 1982).

Subklonierung von cDNA in Plasmide

Die gereinigte DNA der Lambda gt11 Klone wurde mit EcoRI geschnitten, mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert, mit Ethanol gefällt, der Niederschlag mit 70 % Ethanol gewaschen, lyophilisiert und in H₂O gelöst. Durch EcoRI-Spaltung erfolgte die Linearisierung der Plasmid-DNA (pTZ18R), anschließend wurden die Enden mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliert, Protein durch Extraktion mit Phenol/Chloroform (1:1) entfernt und die DNA wie oben beschrieben gereinigt. Die Plasmid-DNA wurde mit den cDNA-Fragmenten aus den Phagen bei ca. 10°C (über Nacht oder länger) mit Hilfe von T4-DNA Ligase (1 Unit pro 20 µl-Ansatz; Weiss et al., 1968) verknüpft. Das Molverhältnis Vektor/Insert betrug 2/1, die DNA-Konzentration lag zwischen 1 und 4 µg/10 µl. Die Transformation von kompetenten Zellen (DH5) mit Plasmid-DNA erfolgte nach Vorschrift (Produktbeschreibung von BRL, Karlsruhe).

"Southern-Blot" und Hybridisierung von cDNA mit radioaktiv markierten Sonden

Soweit Subklone durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden charakterisiert werden sollten, wurde jeweils 1,5 µg Plasmid-DNA mit EcoRI gespalten und die Fragmente auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Gellauf erfolgte eine Bestrahlung mit UV-Licht (302 nm, 10 µW/cm², mindestens 1 min.), anschließend wurde denaturiert (2 x 15 min. in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), mit H₂O gewaschen, neutralisiert (2 x 15 min. in 0,5 M Tris/HCl pH 7,4, 1,5 M NaCl) und die DNA durch Elektrottransfer ("FastBlot"-Gerät) auf einen Nitrocellulosefilter übertragen. Dieser wurde 3 x 10 min. in 2 x SSC gewaschen, und die DNA in einem Vakuumofen bei 80°C (2 Stunden) fixiert. Die Synthese der radioaktiven Sonden erfolgte nach der "Oligolabeling"-Methode (Feinberg & Vogelstein, 1983 und 1984), die anschließende Reinigung durch Gel-Chromatographie ("Nick"-Säule). Die spezifische Aktivität betrug zwischen 10⁶ und 10⁷ cpm/µg DNA (Cerenkov-Zählung).

Die Hybridisierungen wurden wie oben beschrieben mit folgenden Abweichungen durchgeführt: die Hybridisierungstemperatur (über Nacht) betrug 68°C und die Filter wurden bei 68°C gewaschen (1 h in 3 x SSC, 3 x Denhard, 0,1 % SDS, 0,5 h in 3 x SSC, 0,1 % SDS und 0,5 h in 0,5 x SSC, 0,1 % SDS).

DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der cDNA erfolgte nach einer modifizierten Methode des Kettenabbruchverfahrens (Sanger et al., 1977), wobei die Plasmid-DNA mit Klenow-Enzym (Chen & Seeburg, 1985) oder AMV reverser Transcriptase (Graham et al., 1986) sequenziert wurde. Die radioaktive Markierung der DNA erfolgte durch den Einbau von (α - 32 S)dATP. Für die einzelnen Sequenzierungsreaktionen mit Klenow-Enzym (bei 37°C durchgeführt) wurden die Nukleotidmischungen wie folgt verändert:

Nukleotidmischungen für die
A-Reaktion C-Reaktion G-Reaktion T-Reaktion

dTTP	100 μ M	100 μ M	100 μ M	5 μ M
dCTP	100 μ M	10 μ M	100 μ M	100 μ M
dGTP	100 μ M	100 μ M	5 μ M	100 μ M
ddGTP	-	-	100 μ M	-
ddCTP	-	100 μ M	-	-
ddATP	25 μ M	-	-	-
ddTTP	-	-	-	350 μ M

Als Starter wurden der "M13 Reverse Sequencing Primer", der "T7-Promotor Primer", ein aus eigener Synthese stammender Starter (5'-TGTAACGACGGCCAGTG-3'; der an beiden Enden um ein Nukleotid kürzer ist als der käufliche "Universalprimer") und spezifische Starter, die von bereits bekannten Sequenzdaten abgeleitet wurden (siehe dazu die Seiten 24-26 und 38-39), eingesetzt. Die Oligonukleotidsynthese erfolgte entsprechend der Sondersynthese (siehe "Durchmustern der humanen Leber-cDNA-Genbank").

Die Maße der zur Sequenzgelelektrophorese verwendeten Gele waren 20 x 40 cm und 20 x 60 cm bei einer Dicke von 0.2 mm bzw. 0.2 - 0.4 mm (Keilgel. "Guidelines for quick and simple plasmid sequencing" von Boehringer Mannheim, 1986). Die Acrylamidkonzentration war stets 6 %. Die Verzerrung der Banden im Randbereich des Geles wurde durch Anbringung einer Aluminiumplatte, die für eine gleichmäßige Wärmeverteilung sorgte, vermieden. Außer bei den Keilgelen erfolgte jeweils ein kurzer und ein langer Gellauf.

Das Zusammensetzen der überlappenden cDNA-Fragmente, die Auswertung der vollständigen cDNA- und Aminosäuresequenzen, sowie die Vergleiche dieser Sequenzen mit Sequenzdaten bekannter Proteine wurden mit Hilfe des Computerprogrammes Micro-Genie[®] (Beckman) durchgeführt.

Immunologische Untersuchungen von Fusionsproteinen sowie von Carboxypeptidase N und H-Kininogen

Nach Saul und Yeganeh (1986) wurden rekombinante Fusionsproteine der isolierten Phagenklone durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Übertragung der Proteine auf Nitrocellulosefilter (Elektrotransfer mit dem "FastBlot"-Gerät), wobei die Übertragungsbedingungen für unterschiedlich große Proteine nach Otter et al. (1987) angepaßt wurden. Gesamtprotein wurde nach Moeremans et al. (1985) durch Silberfärbung nachgewiesen. Einzelne Proteine wurden durch selektive Immunfärbung mit Hilfe geeigneter Antikörper und dem "alkalischen-Phosphatase-System" oder dem "Meerrettich-Peroxidase-System" dargestellt. Die Verdünnung des ersten Antikörpers betrug 1 : 1.500 (Anti-Carboxypeptidase N-IgG, 10 mg/ml) bzw. 1 : 1.000 (Antiserum gegen die H-Kette, die L-Kette oder gegen beide Ketten des HMW-Kininogens), die des zweiten Antikörpers betrug 1 : 200 (Biotinylierte-anti-Kaninchen-IgG), 1 : 500 (Biotinylierte-anti-Ziege-IgG), 1 : 400 (Biotin-Streptavidin-Peroxydase-Komplex), 1 : 7.500 (Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase) sowie 1 : 1.000 (Anti-Ziege-IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase).

Zur Untersuchung der Proteinpräparationen wurden 11 µg Carboxypeptidase N und 10 µg H-Kininogen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Gradientengel 10 - 18 %; Laemmli, 1970) aufgetrennt. Die Übertragung auf Nitrocellulosefilter und die entsprechende Anfärbung erfolgte wie oben beschrieben.

Zur Untersuchung von Carboxypeptidase N und H-Kininogen mittels Gelchromatographie (Sephacryl S-300; Säule: 0.5 mm x 10 cm. 2 ml; Puffer: 50 mM Tris, pH 7,2, 50 mM NaCl) wurde Carboxypeptidase N (5.7 µg/ 50 µl), H-Kininogen (5.0 µg/ 50 µl) oder ein Gemisch aus beiden Proteinen (5.7 µg CPN und 5.0 µg HK in 100 µl) aufgetragen.

Das Eluat wurde in Fraktionen ($800 \pm 50 \mu\text{l}$) aufgefangen. Der Nachweis der beiden Proteine in den einzelnen Fraktionen erfolgte nach Polyacrylamidgelelektrophorese durch selektive Immunfärbung von "Western Blots" wie oben beschrieben.

4. ERGEBNISSE

Durchmustern der cDNA-Expressionsbibliothek mit Anti-Carboxypeptidase N-Antikörpern und Charakterisierung der gefundenen Klone

Der Biosyntheseort von Carboxypeptidase N wurde bisher nicht beschrieben. Es war jedoch naheliegend, ihn in der Leber zu vermuten, da das Protein aus Schweineleber isoliert werden konnte (Oshima et al., 1975). Außerdem scheint der Plasmaspiegel von Carboxypeptidase N bei bestimmten Lebererkrankungen erniedrigt zu sein (Erdös et al., 1965). Folglich sollte es möglich sein, Carboxypeptidase N-Klone aus einer humanen Leber-cDNA-Bibliothek zu isolieren. Eine humane Leber-cDNA-Bibliothek stand zur Verfügung. Ihre Konstruktion ist im Detail bei Kwok et al. (1985) beschrieben. Fremd-DNA ist in die singuläre EcoRI-Restriktionsspaltstelle des lacZ-Gens eingebaut, das Teil des Klonierungsvektors Lambda gt11 ist. Der Titer dieser cDNA-Bibliothek wurde zu 2.5×10^{10} pfu/ml bestimmt. Der Rekombinantenanteil betrug etwa 60 %, wie durch die Bildung farbloser Plaques auf dem lac⁻ Wirtstamm E. coli Y1090 in Gegenwart von 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid und dem Induktor Isopropyl-β-D-thio-galaktopyranosid nachgewiesen wurde. Da es sich um eine bereits amplifizierte Bibliothek handelte, war die für eine erfolgreiche Detektion von Carboxypeptidase N-Klonen notwendige Zahl zu sichtender Rekombinanten nicht mit Sicherheit abzuschätzen. Um cDNA von mRNA geringer Häufigkeit mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % isolieren zu können werden in der Literatur Werte von ca. 170.000 angegeben (Maniatis et al. 1982). 220.000 rekombinante Phagenklone wurden gesichtet. Vier unabhängige Klone, im folgenden als MS1, MS2, HK1 und HK2 bezeichnet, wurden gefunden. Die Färbung der Plaques mit dem verwendeten "alkalischen-Phosphatase-System" war bei den Klonen MS1 und MS2 intensiver als bei den Klonen HK1 und HK2. Um die Fusionsproteine der vier Klone näher zu charakterisieren, wurde vom gesamten Protein der entsprechenden Plaques ein "Western Blot" angefertigt und durch Silberfärbung (Abb. 4.1.) das Gesamtprotein bzw. durch

selektive Immunfärbung (Abb. 4.2.) das Fusionsprotein angefärbt. Bei den Klonen MS1, MS2, HK1 und HK2 sind Fusionsproteine der β -Galaktosidase mit einem Molekulargewicht von $M_r > 116.000$ deutlich zu sehen (Abb. 4.1.). β -Galaktosidase selbst erscheint in der Kontrollbahn (Abb. 4.1., rechte Bahn) wie erwartet bei einem M_r -Wert von 116.000. Bei jedem der vier Klone können mehrere, unterschiedlich große Proteinbanden nachgewiesen werden. Sie könnten durch teilweisen Abbau der Fusionsproteine entstanden sein. Bei der Immunfärbung (Abb. 4.2.) ist die höhere Empfindlichkeit des "alkalischen-Phosphatase-Systems" gegenüber dem "Meerrettich-Peroxidase-System" deutlich sichtbar. Das Bandenmuster der Klone HK1 und HK2 ist, bis auf Intensitätsunterschiede, nahezu gleich; alle bei diesen Klonen mit Silberfärbung nachgewiesenen Fusionsproteine werden auch immunologisch angefärbt. Wie später gezeigt werden wird, sind die beiden Klone sequenzidentisch. Bei Klon MS2 sind die Fusionsproteine im Western Blot ebenfalls zu sehen, während diejenigen von Klon MS1 immunologisch kaum nachweisbar sind. Es wurde nicht weiter untersucht, ob die letztgenannte Beobachtung auf schneller Degradation des Fusionsproteins beruht oder andere Ursachen hat.

Im "Western Blot" war die Immunfärbung ("alkalisches-Phosphatase-System") der kleinen und der großen Untereinheit von Carboxypeptidase N unterschiedlich stark (siehe Abb. 4.9., Seite 30). Die schmale Bande der kleinen Untereinheit wird intensiv angefärbt, während die große Untereinheit als breiter, schwach gefärbter Fleck erscheint. Möglicherweise ist hierfür die ausschließliche Glykosylierung der großen Untereinheit verantwortlich. Da dem klonierten Material die Zuckerreste fehlen, läßt sich über die Intensität der immunologischen Anfärbbarkeit der Fusionsproteine keine Vorhersage machen.

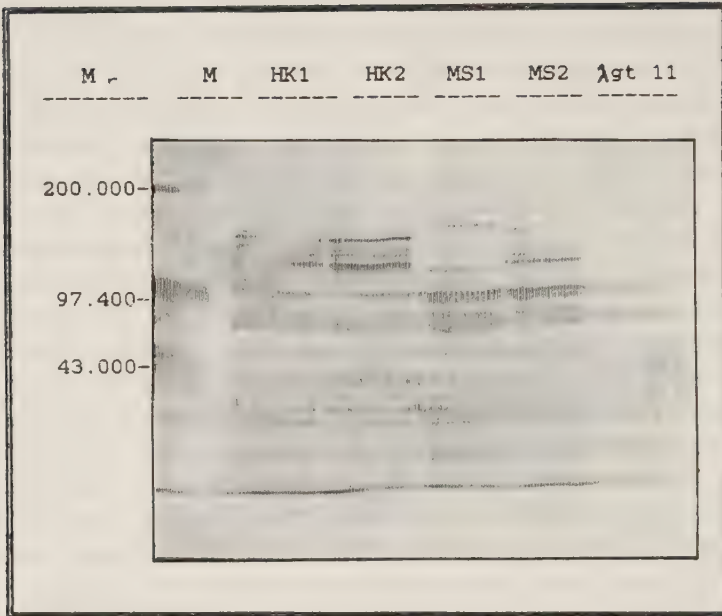


Abb. 4.1.: Gesamtprotein von Klon MS1, MS2, HK1 und HK2.

Protein aus den Plaques der Phagenklone MS1, MS2, HK1 und HK2 wurde durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (7.5 %) aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter übertragen und durch Silberfärbung angefärbt. M = Marker

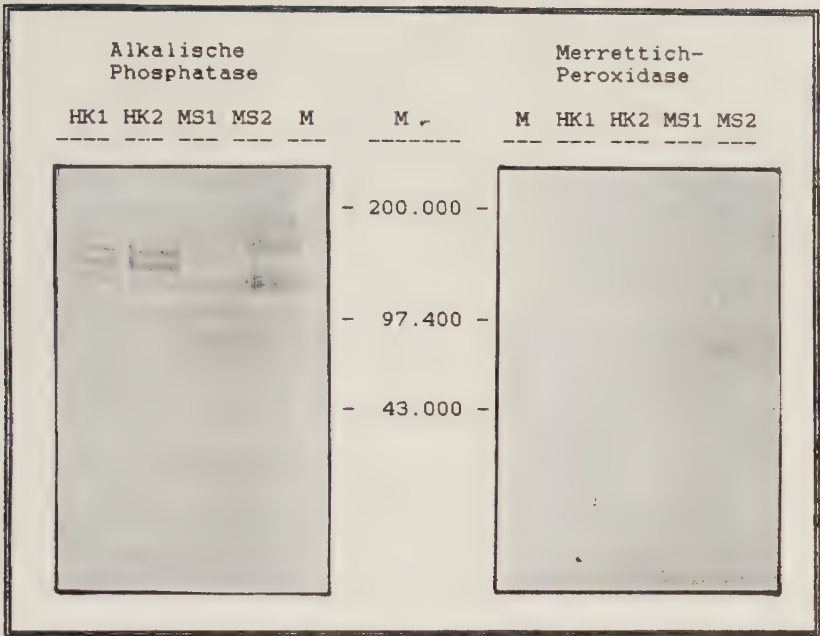


Abb. 4.2.: Immunfärbung von Fusionsproteinen.

Protein aus den Plaques der Phagenklone MS1, MS2, HK1 und HK2 wurde durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (7.5 %) aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter übertragen und mit Anti-Carboxypeptidase N-Antikörpern inkubiert. Bei der linken Hälfte erfolgte die Anfärbung mit dem "alkalischen-Phosphatase-System", bei der rechten Hälfte mit dem "Meerrettich-Peroxidase-System".
M = Marker.

Die Phagen-DNA der vier Klone wurde isoliert, mit EcoRI gespalten, auf einem Agarosegel analysiert und die Länge der cDNA bestimmt (Tabelle 4.1.). Da die direkte Sequenzierung der cDNA-Fragmente im Phagen Lambda gt11 mit der Sanger-Methode oft schlechte Ergebnisse liefert, wurde die cDNA der vier Klone in das Plasmid pTZ18R umkloniert. Dieser Klonierungsvektor entspricht im wesentlichen dem bekannten pUC18. Insbesondere die multiple Klonierungsstelle ist identisch. Zusätzlich sind der Replikationsursprung des Phagen f1 sowie eine dem Polylinker benachbarte T7 Promotorsequenz vorhanden, werden in dieser Arbeit jedoch nicht genutzt. Die Überprüfung der erhaltenen Subklone erfolgte wiederum durch EcoRI-Spaltung der Plasmid-DNA und anschließende Agarosegelelektrophorese. Die bei den Subklonen gefundenen Insertlängen sind in Tabelle 4.1. aufgeführt.

Klon	Fragment aus Lambda gt11 (Bp)	Fragment aus Plasmid pTZ18R (Bp)
HK1	1000	1000
HK2	1000	1000
MS1	1000	1000; 1100; 250
MS2	2500	2500

Tabelle 4.1.: cDNA-Längenvergleich der rekombinanten Phagenklone und der davon abgeleiteten Subklone

Die von den Phagenklonen HK1, HK2 und MS2 abgeleiteten Subklone unterschieden sich laut Restriktionsanalyse mit Enzymen, die auch im Bereich des Polylinkers spalten, nur durch die Einbaurichtung der cDNA in das Plasmid (siehe auch Abb. 4.5.). Von Klon MS1 wurden überraschend zwei zusätzliche Subklone erhalten (1100 und 250 Bp). Als Erklärung wurden interne EcoRI-Spaltstellen der cDNA, Überverdau (EcoRI*-Spaltung) bei der Subklonierung oder DNA-Unreinigungen (chromosomale E. coli-DNA) vermutet. Spaltung isolierter Lambda gt11-DNA und solcher des Phagenklons MS1 mit den Restriktionsenzymen KpnI und PvuI, die die Vektor-DNA zu beiden Seiten der EcoRI-Spaltstelle, in die kloniert wurde, schneiden.

ergab neben reiner Vektor-DNA Fragmente von 2240 Bp (Lambda gt11) bzw. 3300 Bp (Klon MS1). Der Längenunterschied dieser beiden Restriktionsspaltstücke entspricht der Länge der cDNA und beträgt demnach 1000 - 1100 Bp. Eine interne EcoRI-Schnittstelle konnte somit ausgeschlossen werden. Um festzustellen, welcher der drei Subklone vom Klon MS1 abstammte, wurde die Plasmid-DNA der Subklone mit EcoRI gespalten, durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter übertragen und mit radioaktiv markierter Lambda gt11-DNA bzw. mit radioaktiv markierter DNA des Lambda-Klones MS1 hybridisiert. Von den Insertionen der drei Subklone hybridisierte nur das 1000 Bp-Fragment mit dem ursprünglichen Lambda-Klon (Abb. 4.3.). Ein EcoRI-Überverdau (EcoRI*-Spaltung) der Phagen-DNA ist auszuschließen, da keine der Insertionen mit Lambda gt11-DNA hybridisierte. Durch vollständige (250-Bp-Fragment) bzw. teilweise (1100-Bp-Fragment) Sequenzierung der zusätzlichen Subklone und anschließendem Sequenzvergleich mit DNA- und Aminosäuredaten von bisher bekannten Proteinen (GenBank, #52, 9/87; NBRF, #13 9/87) wurden keine zusätzlichen Anhaltspunkte zur Identität bzw. Herkunft dieser zusätzlichen und wohl artifiziellen Subklone erhalten.

Die Sequenzierung der Klone MS1 und MS2 erfolgte zuerst von den Rändern aus. Die Sequenzen der verbliebenen Bereiche wurden mit Hilfe von verkürzten Subklonen erhalten. In der cDNA beider Klone waren Restriktionsspaltstellen vorhanden, die auch in der multiplen Klonierungsstelle vorkommen. Durch das Herausspalten von DNA-Stücken mit diesen Restriktionsenzymen konnten verkürzte Subklone gewonnen werden, die erneut ansequenziert wurden. Auf diesem Weg konnten weite Bereiche der cDNA sequenziert werden. Entsprechend wurde mit allen Subklonen mit entgegengesetzter Orientierung der cDNA verfahren (Abb. 4.4. und 4.5.). Verbliebene Lücken wurden durch Verwendung eigens synthetisierter, sequenzspezifischer Starter geschlossen. Zweifelhafte Positionen konnten auf ähnlichem Weg aufgeklärt werden.

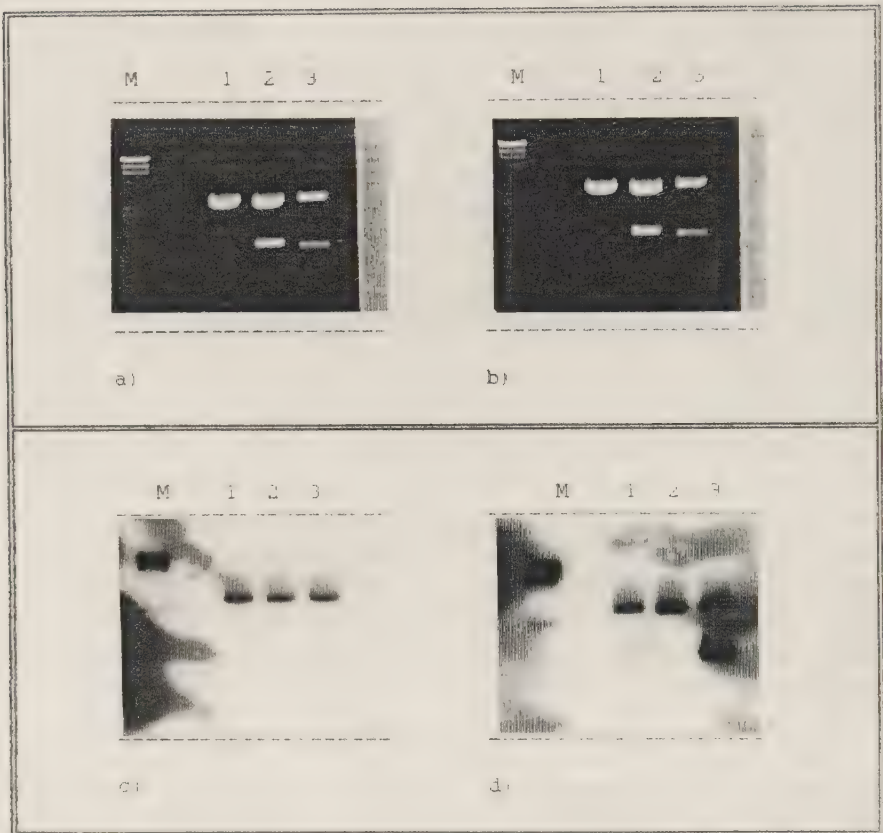


Abb. 4.3.: Analyse der drei Subklone von Klon MS1.

a und b: Agarosegelelektrophorese der Fragmente nach EcoRI-Spaltung.

c: Hybridisierung mit radioaktiv markierter Lambda gt11-DNA.

d: Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA des Phagenklones MS1. Nur das 1000-Bp-Fragment hybridisiert mit der DNA des Originalklones.

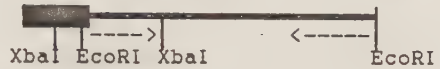
1: Klon MS1 (250 Bp-Fragment); 2: Klon MS1 (1100 Bp-Fragment); 3 = Klon MS1 (1000 Bp-Fragment)

M = Marker Lambda gt11/HindIII)

Klon MS1(A1) (750 Bp)



Klon MS1(A)



Klon MS1(B)



Klon MS1(B1) (250 Bp)



Abb. 4.4.: (Seite 22) Klon MS1: Sequenzierungsstrategie und Restriktionskarten der Subklone und davon abgeleiteter verkürzter Subklone.

Durch Herausspalten des XbaI-Fragmentes aus Subklon MS1(A), im Leseraster in das Plasmid eingebaut, bzw. MS1(B), in umgekehrter Orientierung eingebaut, entstanden die am 5'-Ende verkürzten Klone MS1A1 und MS1B1.

- : multiple Klonierungsstelle
- >: sequenzierter Bereich
- : cDNA-sequenzspezifische Starter

Abb. 4.5.

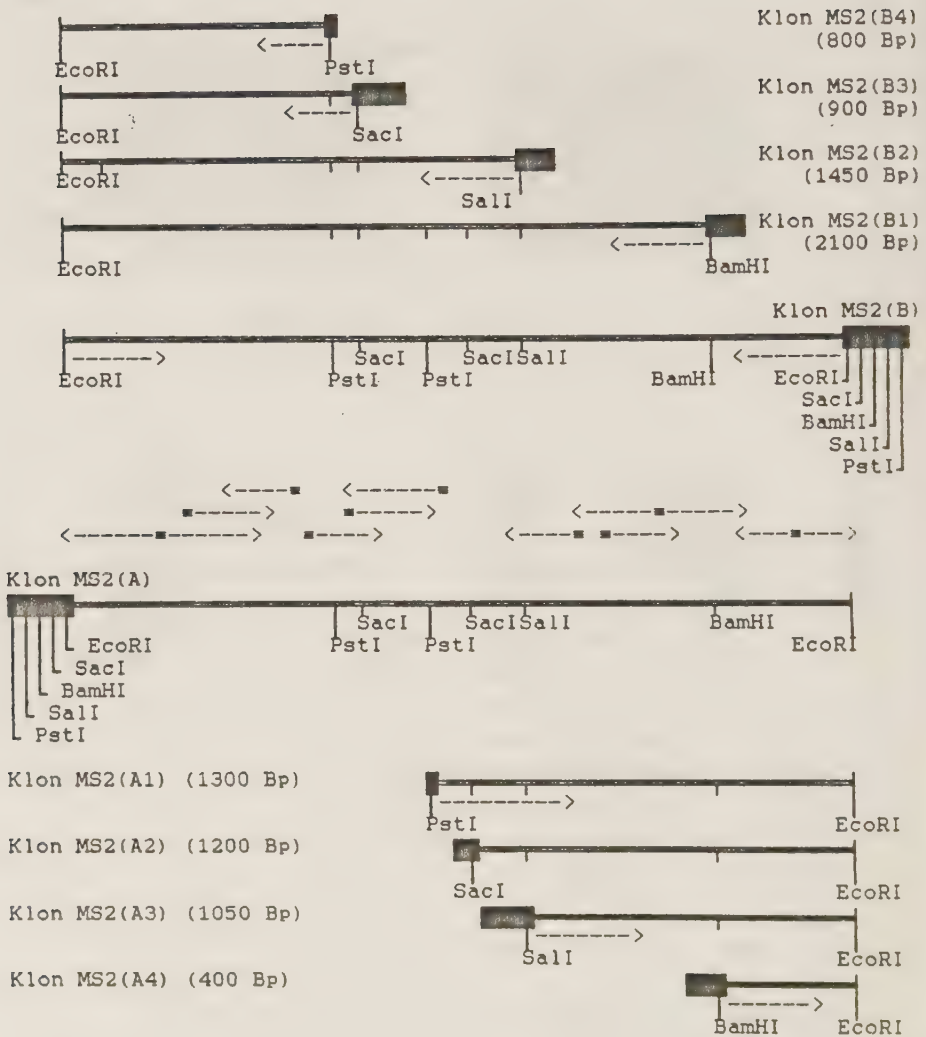


Abb. 4.5.: Klon MS2: Sequenzierungsstrategie und Restriktionskarten der Subklone und davon abgeleiteter verkürzter Subklone.

Durch Herausspalten der entsprechenden Restriktionsfragmente aus den Subklonen MS2(A), im Leseraster in das Plasmid eingebaut, bzw. MS2(B), in umgekehrter Orientierung eingebaut, entstanden die am 5'-Ende verkürzten Klone MS2(A1-4) und MS2(B1-4).

■ ■ ■ ■ : multiple Klonierungsstelle
 ---->: sequenzierter Bereich
 ■: cDNA-sequenzspezifische Starter

In Abb. 4.6. und in Abb. 4.7. sind die vollständigen cDNA-Sequenzen der beiden Klone MS1 und MS2 sowie die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen für den Bereich der offenen Leseraster wiedergegeben.

Aus den Sequenzdaten von Klon MS1 läßt sich ein durchgehender offener Leseraster ableiten, der für die C-terminalen 243 Aminosäuren eines unbekannten Proteins kodiert. Bei Klon MS2 gibt es ein offenes Leseraster von wenigstens 497 Aminosäuren. Auch hier handelt es sich um den C-terminalen Teil eines bisher nicht beschriebenen Proteins. Da einige Stellen in dieser Sequenz bisher nicht eindeutig aufgeklärt wurden, lassen sich zur Länge des offenen Leserasters allerdings noch keine endgültigen Aussagen machen.

Abb. 4.6.: cDNA-Sequenz von Klon MS1 und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz.
Die für die Verkürzung der Klone notwendigen Restriktionsspaltstellen sowie die verwendeten Starter (--->) sind angegeben.

EcoRI
 GAATTC CATATG TGTGACTG GCGAAAACACAGCTCTATAACTATTTCACAGATACATTATACCATTAAATGATGACGGTGTATCTATTGTCAGAGGACGCAAA
 E F H I V T G E N T V Y N T I H R L H Y T I N D D G D L L Y R D A

150
 TCCCCCTCGATTTTGATCAAAACCAATG GGGATGATGTTTCG GGAATAGCAGTATAGTAGAGAGACTGCGTGTATGACAAAAACCAAGATGCTACGGAAGC
 I P L D F D Q T N G D D G S G I D S I V R D C V Y D K N Q D A T E

XbaI
 250
 CTTCTTG AATGATGAGGAGTCCATATCAGGCACTTCAGATGTTGATG AAAATG GATATTCGATTATACGACAGTATTCTGCACAATGAGGAGTCAAAAC
 F L N D E E S I S G I L D V D E N G D I R L Y D S Y S D N E E S N

350
 AGTTTTC ACTTGCACAGCAGAGTTATTG AAAACTATAACAGAACCTTTGTCG GAACTAAACTTCATGGACTAGGCACTGAATCATGTACTACAGATG
 S F H L P D E V I E N Y N K N H L C E T K L H G L G T E S C T T D

450
 ATCCGCACTGCGAAATCAAAATACGAATGAGTTTCTACAGGAGTCAGACATGTTTGC GCAAGTACCGCTTATACCAACACCCCTTCATACAAATTCGAT
 D P D T G N Q I T N E F S T G S Q T C L P S T A Y T T P L H T N S I

550
 TAAACTTCACACATTACGCTACACAGAATCTTCACTACCAAGGCGAATCAGACTCTTTCTCTAATCTG AAGATTAGAGAATAGAGGATATTGACGAC
 K L H T L R Y T E S S L P K P N Q T L F S N L E D L E I E D I D D

650
 AATGATGATGTTTCAGATGATCATATCGAGGAGCTGGATGCTTTAGACGAGGAACCTTATAGAGGAATGTCG AAGTTATAAACAGCAGAACCATCAAA
 N G S V S D V H I E E L D A L D E E L Y K R M S K V I K Q Q N H Q

750
 CGACAAAAATATAGCGAAAAATGATTATTGACTGTGCAATAAACGCTGCTGGAAGG GCGCTTGCAACAAAAGATGATCACA AAAATGATACCCATTA
 T T K N I A K N D Y Stop

900
 ATACACATAGGCTCAGCCATTACTATTATTATATATATCATCAAGATTGCAATTTGTAATTTTATGAGTCTCTCTTAATAATACATGAGGCTTTTIT

950
 TAATATTTTCGGAATCAACGAGAGTACATATTTCTATCCGATGATACCGAGATAAATGAAGATAGTAACTAACCAATGAAAAAAGAGCGAGAAATAAAT

EcoRI
 AAGGGAATTC

Abb. 4.7.: cDNA-Sequenz von Klon MS2 und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz.

Die für die Verkürzung der Klonen notwendigen Restriktionsspaltstellen sowie die verwendeten Starter (--->) sind angegeben.

[illegible]

2450 EcoRI
AGGCAAGGGGCAAGAGACTCCGCTCACTCCNNACG6CCAGCCTGGNCACAGGACTGACCCCTTCTTCAGAGATAATGACGGAATTC

Der Nachweis der Identität der cDNA-Klone MS1 und MS2 mit solchen, die für die große oder kleine Untereinheit von Carboxypeptidase N kodieren, ist nur durch Vergleiche der offenen Leserahmen mit Aminosäuredaten dieser Proteine möglich. Im Gegensatz zur kleinen Untereinheit, von der die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren bestimmt werden konnten (siehe Seite 35), liegen von der großen Untereinheit bisher keine Aminosäuredaten vor. Da die gefundenen Klone lediglich für die C-terminalen Bereiche unbekannter Proteine kodieren und die Sequenzanalyse keinerlei Anhaltspunkte für eine Ähnlichkeit zu bereits bekannten Carboxypeptidasen ergab, war es notwendig, die Genbank durch Plaquehybridisierung mit einer Carboxypeptidase N-spezifischen, radioaktiv markierten Sonde erneut zu sichten (siehe weiter unten "Isolierung und Charakterisierung eines cDNA-Klones für Carboxypeptidase N"). Die cDNA-Sequenz des dabei isolierten, für die kleine Untereinheit von Carboxypeptidase N kodierenden Klones, zeigt keinerlei Übereinstimmung zu einem der vier in diesem Abschnitt beschriebenen Klone. Doch bleibt zu zeigen, ob nicht einer der bisher nicht zuzuordnenden Klone für die große Untereinheit der Carboxypeptidase N kodiert.

Die Klone HK1 und HK2, deren cDNA von den Rändern aus ansequenziert wurde, kodieren überraschend für einen Teil von H-Kininogen. Beide Klone sind sequenzidentisch und entsprechen der cDNA eines Teils der leichten Kette (684 Bp) und des 3'-untranslatierten Bereiches (379 Bp; Abb. 4.8.) des humanen hochmolekularen Kininogens (Takagaki et al., 1985). Die gefundene Sequenz unterscheidet sich von der bei Takagaki et al. (1985) veröffentlichten durch einen repetitiven Abschnitt am 3'-Ende (13 x TC) und den beiden EcoRI-Linkern. Die Herkunft der TC-Sequenz ist nicht geklärt.

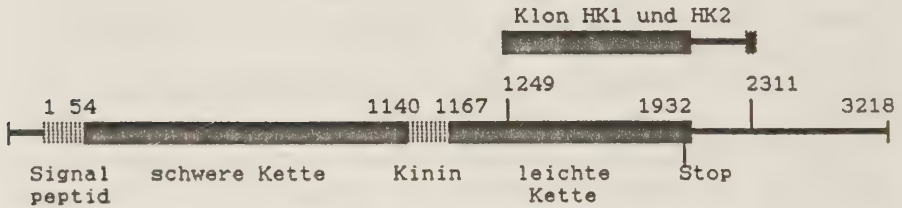


Abb. 4.8.: Schematische Darstellung der cDNA des H-Kininogens (Takagaki et al., 1985) und der Klone HK1 und HK2. Die 1062 Bp lange cDNA von Klon HK1 bzw. HK2 beginnt im Bereich der leichten Kette (82 Bp nach Ende des Kininabschnittes) und endet im 3'-untranslatierten Bereich. Am Ende des Klonen findet sich eine repetitive TC-Sequenz (TC), die in der H-Kininogen-cDNA nicht auftritt (Angaben in Bp).

Spezifitätsuntersuchung der Carboxypeptidase N-Antikörper

Ein möglicher Grund für die Isolierung von H-Kininogen-Klonen mag darin vermutet werden, daß H-Kininogen-spezifische Antikörper in der Anti-Carboxypeptidase N-Antikörperpräparation vorhanden waren, sei es aufgrund identischer Epitope oder aufgrund von Verunreinigungen in der zur Immunisierung verwendeten Proteinpräparation. Dazu wurde die Reaktion sowohl der Anti-Carboxypeptidase N-Antikörper als auch (käuflicher) H-Kininogen-Antikörper mit gereinigter Carboxypeptidase N und H-Kininogen untersucht. Beide Proteine wurden sowohl unreduziert als auch reduziert auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter übertragen, mit Antikörpern gegen Carboxypeptidase N oder H-Kininogen inkubiert und sowohl mit dem "Meerrettich-Peroxidase-System" als auch mit dem "alkalischen-Phosphatase-System" detektiert. In Abb. 4.9. ist der Unterschied zwischen beiden Färbemethoden gut zu erkennen: das "alkalische-Phosphatase-System" ist wesentlich empfindlicher als das "Meerrettich-Peroxidase-System". Mit letzterem wird nur die kleine Untereinheit von Carboxypeptidase N sichtbar gemacht, während das "alkalische-Phosphatase-System" auch die große Untereinheit und eine Reihe weiterer Banden anfärbt. Dabei handelt es sich um Abbauprodukte der großen Untereinheit von Carboxypeptidase N, wie Langzeitversuche in der Arbeitsgruppe zeigten. Die Anfärbung einer Proteinbande (Molekulargewicht etwa 100.000) der H-Kininogen-Präparation (unreduziert) mit Hilfe von Carboxypeptidase N-Antikörpern ist nur mit dem alkalischen-Phosphatase-System möglich. Abb. 4.10. zeigt die selektive Detektion der leichten und schweren Kette des H-Kininogens im unreduzierten und reduzierten Zustand mit den käuflichen Antikörpern gegen H-Kininogen. Während mit dem "Meerrettich-Peroxidase-System" keine Kreuzreaktion des H-Kininogen-Antiserums mit Carboxypeptidase N nachgewiesen werden kann (Abb. 4.11. Bahn 3), wird mit dem "alkalischen-Phosphatase-System" die kleine Untereinheit von Carboxypeptidase N und eine schmale Bande im Bereich der großen Untereinheit von Carboxypeptidase N angefärbt (Abb. 4.11. Bahn 1).

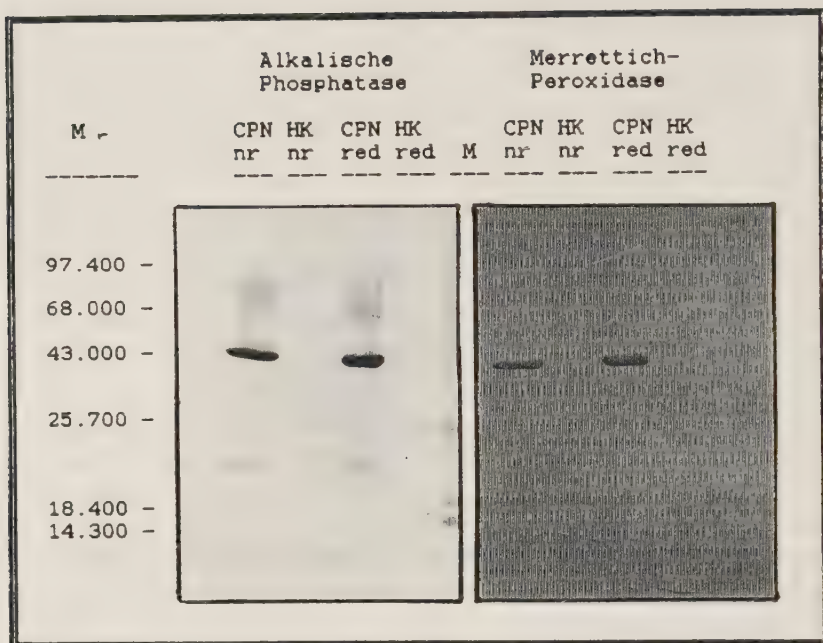


Abb. 4.9.: Reaktion von Carboxypeptidase N und H-Kininogen mit Anti-Carboxypeptidase N-Antikörpern.

Auf einem SDS-Polyacrylamidgel (10 - 18 %) wurden je 10 µg Carboxypeptidase N (CPN; nicht reduziert (nr) und reduziert (red.)) sowie je 10 µg H-Kininogen (H-K; nicht reduziert (nr) und reduziert (red.)) aufgetrennt. Nach der Übertragung auf einen Nitrocellulosefilter wurden diese mit Anti-Carboxypeptidase N-Antikörpern inkubiert. Bei der linken Hälfte erfolgte die Anfärbung mit dem "alkalischen-Phosphatase-System", bei der rechten Hälfte mit der "Merrettich-Peroxidase-Färbung". M = Marker.

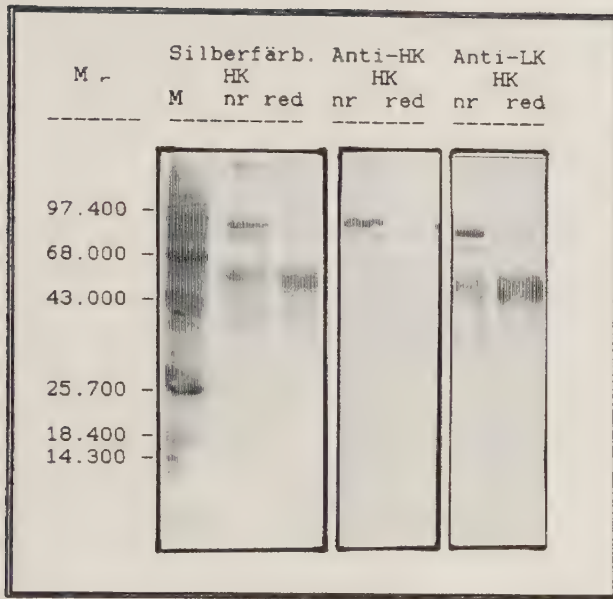


Abb. 4.10.: Reaktion von H-Kininogen mit Anti-H-Kininogen-Antiserum.

Auf einem SDS-Polyacrylamidgel (10 - 18 %) wurden je 10 µg H-Kininogen (H-K; nicht reduziert (nr) und reduziert (red.)) aufgetrennt. Nach der Übertragung auf einen Nitrocellulosefilter wurden diese mit Anti-H-Kininogen-Antiserum gegen die schwere Kette (Anti-HK) und gegen die leichte Kette (Anti-LK) inkubiert; die Anfärbung erfolgt mit dem "Meerrettich-Peroxydase-System". Bei dem linken Filterstreifen erfolgte eine Silberfärbung der Proteine. M = Marker.

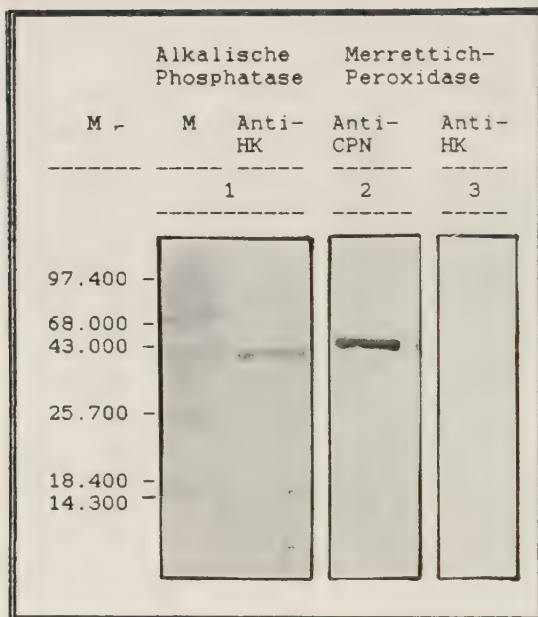


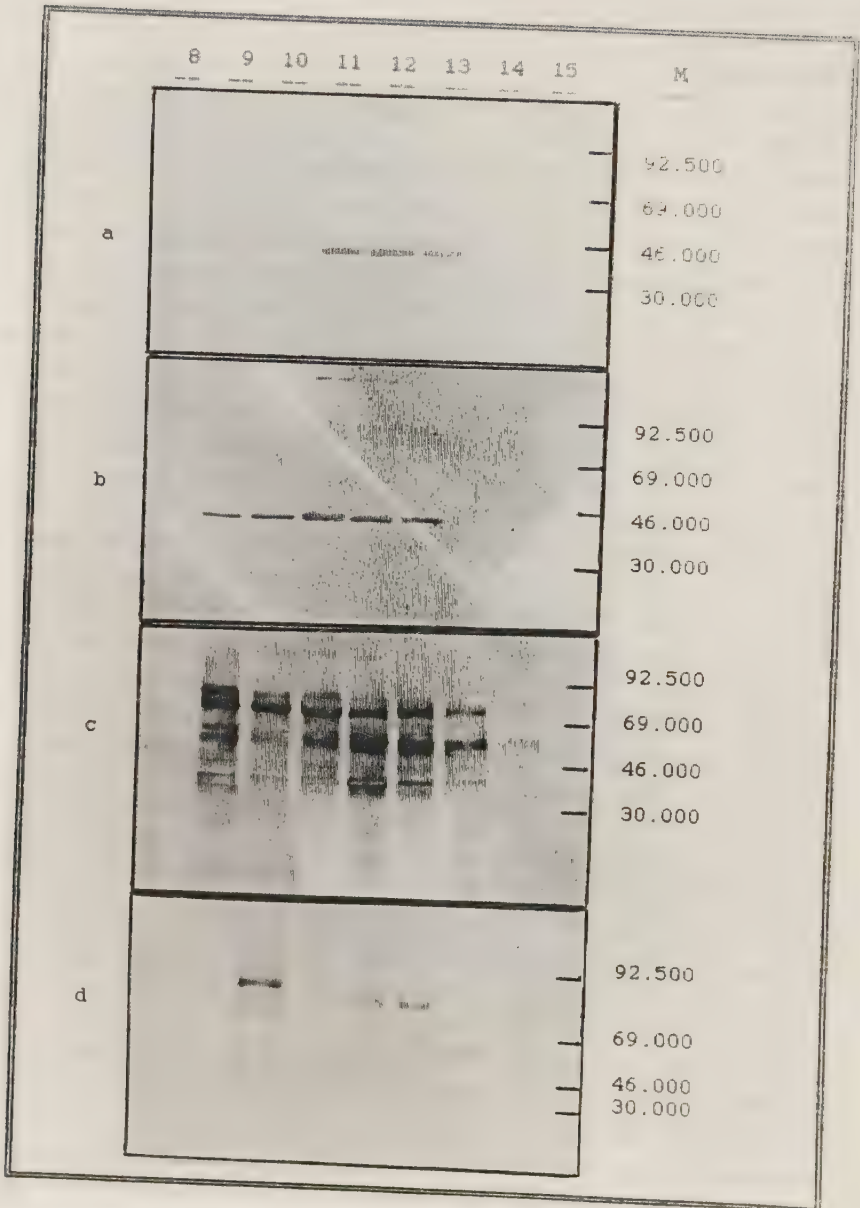
Abb. 4.11.: Reaktion von Carboxypeptidase N mit Anti-H-Kininogen-Antiserum.

Pro Bahn wurden 10 µg Carboxypeptidase N (reduziert) auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf einen Nitrocellulosefilter übertragen. Filter 1 und 3 wurde mit Anti-H-Kininogen-Antiserum (Anti-HK). Filter 2 (zum Vergleich) mit Anti-Carboxypeptidase N-Antikörpern (Anti-CPN) inkubiert. Bei Filter 1 erfolgte die Anfärbung mit dem "alkalischen-Phosphatase-System", bei Filter 2 und 3 mit der "Meerrettich-Peroxidase-Färbung". M = Marker.

Mit dem zum Zeitpunkt der Antikörperisolierung verwendeten "Meerrettich-Peroxidase-System" waren andere Proteine als Carboxypeptidase N nicht nachweisbar. Ein solcher Nachweis konnte erst mit dem später eingesetzten, empfindlicheren "alkalischen-Phosphatase-System", das zum Sichten der Genbank verwendet wurde, geführt werden. Bei der Immunisierung der Kaninchen mit Carboxypeptidase N müssen also auch Anti-H-Kininogen-Antikörper gebildet worden sein. Zwar lieferten gelchromatographische Untersuchungen erste Hinweise, daß Carboxypeptidase N und H-Kininogen (als Träger des Carboxypeptidase N-Substrats Kinin) wie auch immer, assoziieren könnten, doch sind die bisher vorliegenden Ergebnisse sicher nicht beweiskräftig, da die Gelchromatographiebedingungen noch nicht ausreichend standardisiert waren. Beide Proteine wurden sowohl einzeln als auch miteinander gemischt durch Gelfiltration aufgetrennt. Die Elutionsfraktionen wurden immunologisch auf Carboxypeptidase N und H-Kininogen untersucht. Wurden beide Proteine gemeinsam aufgetragen, so wurden sie zumindest teilweise zusammen und bei höherem Molekulargewicht eluiert als in den Fällen, in denen die Proteine einzeln aufgetragen wurden (Abb. 4.12). Spuren von H-Kininogen in der für die Immunisierung verwendeten Carboxypeptidase N-Präparation könnten demnach die Ursache für die beobachtete Unspezifität des Anti-Carboxypeptidase N-Antiserums erklären.

Abb. 4.12 (Seite 34):

Gelchromatographie von Carboxypeptidase N und H-Kininogen
 Das von einer S-300 Sephacryl-Säule eluierte Protein (jeweils Fraktion 8-15) wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (10-18%) aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter übertragen und immunologisch detektiert ("alkalisches-Phosphatase-System").
 a: Carboxypeptidase N alleine und Carboxypeptidase N-spezifische Immunfärbung. b: Carboxypeptidase N und H-Kininogen gemischt und Carboxypeptidase N-spezifische Immunfärbung. c: Carboxypeptidase N und H-Kininogen gemischt und H-Kininogen-spezifische Immunfärbung. d: H-Kininogen alleine und H-Kininogen-spezifische Immunfärbung.



Isolierung und Charakterisierung eines cDNA-Klons für Carboxypeptidase N

Nach Isolierung der Carboxypeptidase N aus Plasma entsprechend einem in der Literatur beschriebenen Verfahren (Plummer & Hurwitz, 1978), Charakterisierung durch enzymatische Tests (Skidgel & Erdös, 1984) und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese konnte die kleine Untereinheit durch Ausschneiden aus einem mit "Coomassie Brilliant Blue" gefärbten SDS-Polyacrylamidgel (10-18 %) abgetrennt werden. Nach weiterer Reinigung des Proteins (Elektroelution, Entsalzen an einer Biogel PD-10-Säule und Chromatographie an einer ODS-Säule nach Simpson et al., 1987) konnte die N-terminale Aminosäuresequenz der kleinen Untereinheit von Carboxypeptidase N am Gasphasensequenator bestimmt werden:

NH₂-Val-Thr-Phe-Arg-His-His-Arg-Tyr-Asp-Asp-Leu-Val-Arg-Thr-Leu-Tyr-Lys-Val-Gln-Asn

Basierend auf dieser Sequenz wurde die Genbank mit einer radioaktiv markierten Sonde erneut durchgemustert. Die Codonauswahl der 59 Basen langen Sonde

5'-GTGACCTTCCGGCATCATCGGTATGATGACCTGGTGGGACCCTGTACAAGGTGCAGAA-3'

erfolgte nach den bei Lathe (1985) beschriebenen Kriterien (siehe Diskussion).

Beim Sichten der cDNA-Bibliothek mit dieser Sonde wurde unter etwa 60.000 rekombinanten Phagenklonen ein positiver Klon (CPN1) gefunden. Aufgrund der gewählten, wenig stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen (siehe Seite 8) war das Signal/Untergrund-Verhältnis relativ schlecht; das von der radioaktiven Sonde erzeugte Signal hob sich nur schwach, aber dennoch deutlich vom Untergrund ab. Nach zwei weiteren Hybridisierungsrounds konnte der Klon rein isoliert werden. Zur weiteren Untersuchung wurde DNA des Phagenklones isoliert, mit EcoRI gespalten und die erhaltenen Fragmente auf einem Agarosegel analysiert. Die Länge der eingebauten cDNA betrug etwa 1.700 Bp. Nach dem Umklonieren in das Plasmid pTZ18R (siehe auch Seite 18) betrugen die Insertlängen der Sub-

Klone ebenfalls etwa 1.700 Basenpaare (Abb. 4.13.). Mittels Restriktionskartierung mit den Enzymen der multiplen Klonierungsstelle (Abb. 4.13) konnten zwei Klone mit gegensätzlicher Orientierung ausgewählt und anschließend in beiden Strängen von den Rändern aus ansequenziert werden. Zur Verkürzung der Klone nach der auf Seite 19 für die Klone MS1, MS2, HK1 und HK2 beschriebenen Sequenzierungsstrategie waren diese Spaltstellen jedoch wenig ge-

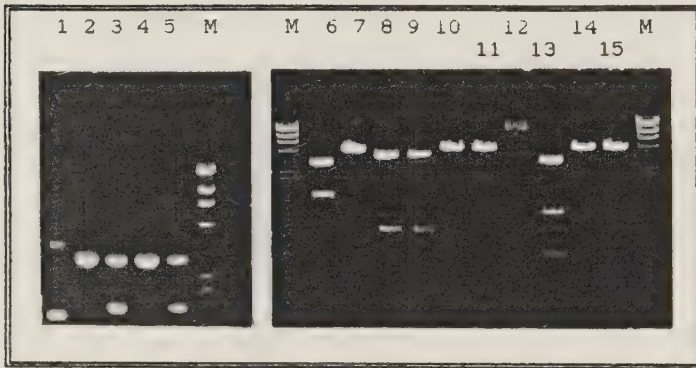


Abb. 4.13.: Restriktionsanalyse von Plasmid pCPN1.

Dieses Plasmid entstand durch die Umklonierung der cDNA von Klon CPN1 in die EcoRI-Spaltstelle des Plasmids pTZ18R.

- | | |
|--------------------------------|-----------------------------|
| 1: pTZ18R ungespalten | 2: pTZ18R/EcoRI gespalten |
| 3: pCPN1/EcoRI gespalten | 4: pTZ18R/EcoRI gespalten |
| 5: pCPN1/EcoRI gespalten | |
| 6: pCPN1/SacI gespalten | 7: pCPN1/KpnI gespalten |
| 8: pCPN1/SmaI gespalten | 9: pCPN1/AvaI gespalten |
| 10: pCPN1/BamHI gespalten | 11: pCPN1/XbaI gespalten |
| 12: pCPN1/SalI (teil)gespalten | 13: pCPN1/PstI gespalten |
| 14: pCPN1/SphI gespalten | 15: pCPN1/HindIII gespalten |
- Marker: Lambda/HindIII gespalten (23.130 Bp, 9.419 Bp, 6.557 Bp, 4.371 Bp, 2.322 Bp, 2.028 Bp, 564 Bp, 125 Bp)

eignet, da sie lediglich zur Aufklärung eines kleinen Teiles der Sequenz hätte verwendet werden können. Sequenziell verkürzte, überlappende Klone konnten jedoch durch Exonuklease III-Abbau erhalten werden (in Abb. 4.14. eingezeichnet). Die Methode ist bei Henikoff (1984) im Detail beschrieben. Mittels speziell synthetisierter Starter (in Abb. 4.14. und 4.15. eingezeichnet) wurden Lücken geschlossen und Sequenzpositionen (Bereiche um Pos. 570, 795, 910, 1220 und 1340), die trotz Sequenzierens in beiden Strängen zunächst nicht eindeutig gelesen werden konnten, endgültig bestimmt. Die vollständige Sequenz ist in Abb. 4.15. dargestellt.

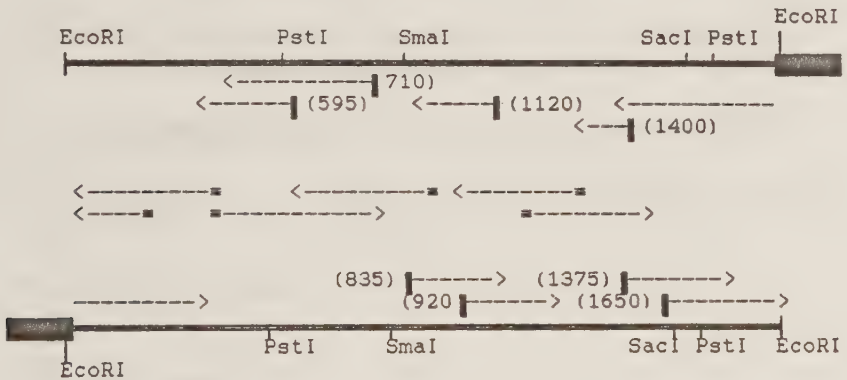


Abb. 4.14.: Schematische Darstellung der in das Plasmid pTZ18R umklonierten cDNA-Fragmente von Klon CPN1 (in beiden Orientierungen).

Die mittels verkürzter Klone (Exonuklease III) erhaltenen Sequenzen (|--->) sowie die mittels cDNA-sequenzspezifischer Starter erhaltenen Sequenzen (■--->) sind angegeben. Der Beginn der verkürzten Klone ist angegeben; die zur Bestimmung der Einbaurichtung im Plasmid verwendeten Restriktions-spaltstellen sind ebenfalls eingezeichnet.

- : multiple Klonierungsstelle
- : cDNA-Sequenzspezifische Starter

Abb. 4.15.: Die vollständige cDNA-Sequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz der kleinen Untereinheit von humaner Carboxypeptidase N.

Die N-terminale Aminosäuresequenz, nach der die Son-
densequenz festgelegt wurde, ist unterstrichen, das
Signalpeptid wird durch hervorgehoben. Die an der
Zinkbindung und der enzymatischen Reaktion beteiligten
Aminosäuren sind mit †, daneben Nr. der Aminosäure,
die basischen Aminosäuren im C-terminalen Bereich mit
x gekennzeichnet (siehe Diskussion).

---->: cDNA-sequenzspezifische Starter

```

      50                                     100
TGAAGGAGGAGTGAAGGAGGAGAGATGAGTGGCTATTCCAGAACGACATAAGGAATTTCCAGCCTTGGACGACAGCTGGGAACGCTCTCCAATTGGAGT

      150                                     200
GGTGTTCACAGCGGGAAGCTAGGTGGACCTTGGATTTTGGCGGGTGAAGAGGCTAGGTTGTTTAAAGGAGGTGGGGCGCGTTTCAGTGGCTCTCTTTGAAG

      250                                     300
<-----
AAAGCCGACGAGATGTGAGACCTGCTCTCAGTCTTCTCTCCAGCTCTCTCTCTCTCTCAAGTTGGTTGGCCCGGTGACCTTTCGCCACCACTGCTATGAT
M S D L L S V F L H L L L L F K L V A P V T F R H H R Y D
-----
      350                                     360
GATCTTGTGGGAGCGCTGTACAGGTTGCAAAACGAAATGCCCGGATCAGCGGGCTACAGCATTGGCGGCAAGCTGGAGGGGAGACACCTCTACGTGC
D L V R T L Y K V Q N E C P G I T R V Y S I G R S V E G R H L Y V
----->
      450                                     500
TGGAGTTCAAGCGACCACTGGGAATCCAGAGCCCTTGGAAACGAGGTTCAAGTATGTGGGGAAACATGACAGCGCAACGAGCGTTGGCCGCGAGCTGAT
L E F S D H P G I H E P L E P E V K Y V G N M H G N E A L G R E L M
                                     †(86) †(89)
      550                                     600
GCTGCAGCTGTGCGAGTTTCTGTGCGAGGAGTTCGGGAACAAGGACCAAGCGATGCTCCAGCTCATCGAGACAGCGCATTCCATCTCTGCTCCATCCATG
L Q L S E F L C E E F R N R N Q R I V Q L I Q D T R I H I L P S M

      650                                     700
AACCCGACGCTACGAGGTGGCTGCTGCCAGGGCCCAACAGGCTGGGTATCTAGTTGGCAAGAACATGCAATGGAGTGGACCTGAACCGCACT
N P D G Y E V A A A Q G P N K P G Y L V G R N N A N G V D L N R N
                                     †(144) †(161)
      750                                     800
TCCCTGATCTCAATACCTATATCTACTATAAGGAGAGTACGAGAGGCCCAACCACTGCTGCTCCAGACAACTGGAAAGTCAAGTGGAGCCGAG
F P D L N T Y I Y Y N E K Y G G P N H L P L P D N M K S Q V E P E

      850                                     900
GACCCGGCGGTGATCGGGTGGATGCACTCCTTCAACTTGTCTTTCAGGCAATCTCCAGGAGGGGGGTTGGTGGCAATTACCGGTATGACAACTG
T R A V I R M M H S F N F V L S A N L H G G A V V A N Y P Y D K S
                                     †(216)
      950                                     1000
TTGAGCAGCGGGTCCGAGGGGTCGCGGCAACCGAGACCCCGAGCGCTGACGACAGGCTCTCCAGAGGCTGGCGAGGTTCTACTCTATGACATG
F E H R V R G V R R T A S T P T P D D K L F Q K L A K V Y S Y A H

```

1710
ABAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Frühere Vermutungen, daß die Leber der Biosyntheseort von Carboxypeptidase N ist, konnten durch die Isolierung eines für die kleine Untereinheit kodierenden Klons aus einer Leber-cDNA-Genbank bestätigt werden. Die cDNA ist 1717 Basenpaare lang und setzt sich aus 5'-untranslatiertem Bereich (213 Bp, Pos. 1-213), kodierendem Bereich (1374 Bp, Pos. 214-1587) und 3'-untranslatiertem Bereich (115 Bp, Pos. 1588-1702) zusammen. Der offene Leserahmen umfaßt 1374 Basenpaare, dies entspricht 458 Aminosäuren. Daraus errechnet sich für das primäre Translationsprodukt ein Molekulargewicht von 52.291. Ohne diejenigen Aminosäuren, die die typischen Merkmale

eines Signalpeptides (in Abb. 4.15. gepunktet dargestellt, siehe auch Diskussion) tragen, verringert sich das Molekulargewicht auf 50.039 (jeweils ohne das Zink-Atom). Unmittelbar an die Signalpeptidsequenz, wie sie aus den Daten bei vonHeijne (1986) abgeleitet werden konnte, schließt sich die zuvor bestimmte N-terminale Aminosäuresequenz (in Abb. 4.15. unterstrichen dargestellt) an. Beim Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der bekannter Proteine wurden eine Ähnlichkeit mit Carboxypeptidase E (49% identische Reste) und geringe Ähnlichkeit mit Carboxypeptidase A und B (siehe Diskussion) gefunden.

5. DISKUSSION

Mit Hilfe Carboxypeptidase N-spezifischer Antikörper und einer immunologischen Nachweismethode konnten aus einer Expressionsgenbank vier Klone isoliert werden. Zwei der vier Klone waren identisch zueinander und kodierten für einen Teil der leichten Kette von H-Kininogen. Mögliche Gründe für die Isolierung dieser Klone wurden im Ergebnisteil diskutiert. Zwei weitere Klone kodieren für den jeweils C-terminalen Teil bisher nicht beschriebener Proteine. Ob einer der gefundenen Klone für die große Untereinheit der Carboxypeptidase N kodiert, konnte bisher nicht nachgewiesen werden, da von dieser Untereinheit noch keine Aminosäuredaten vorliegen. Keiner der Klone kodierte jedoch für die kleine Untereinheit von Carboxypeptidase N. Beim erneuten Durchmustern der Genbank mittels Plaquehybridisierung und einer auf der N-terminalen Aminosäuresequenz der kleinen Untereinheit basierenden radioaktiv markierten Sonde konnte ein Klon isoliert werden, der für dieses Protein kodiert. Da in der Aminosäuresequenz kein Bereich vorkommt, der sich für die Konstruktion einer kurzen, gemischten Sonde geeignet hätte, wurde eine längere Oligonukleotidsonde mit einheitlicher Sequenz konstruiert. Dabei zu erwartenden Fehlpaarungen zwischen Sonde und cDNA wurde durch geeignete Hybridisierungs- und Waschbedingungen mit niedriger Stringenz Rechnung getragen. Um die Abweichungen der Sondensequenz von der cDNA-Sequenz so gering wie möglich zu halten, erfolgte die Codonauswahl nach den bei Lathe (1985) beschriebenen Kriterien und es wurden für humane Proteine bevorzugte Codons ausgewählt. Wie sich später zeigte, stimmt die Sequenz der synthetischen Sonde mit der cDNA-Sequenz in neun Positionen nicht überein (Abb. 5.1.); für sieben Aminosäuren treten in der cDNA Codons auf, die in humanen Proteinen bisher weniger häufig gefunden wurden. Die Übereinstimmung zwischen Sonden- und cDNA-Sequenz beträgt etwa 85 %, was für eine Sonde dieser Länge ein sehr guter Wert ist (Lathe, 1985). Außerdem treten die Fehlpaarungen im 5'-Bereich gehäuft und im 3'-Bereich nur noch sehr vereinzelt auf. Dies begünstigt die Hybridisierung, da bei einer

gleichmäßigen Verteilung der Fehler die gebildeten Hybride weniger stabil sind.

NH₂-ValThrPheArgHisHisArgTyrAspAspLeuValArgThrLeuTyrLysValGlnAsn

```

5'-GTGACCTTTTCGCCACCACCGCTATGATGATCTTGTGCGGACGCTGTACAAGGTGCAAAA-3'
      X  X  X  X  X      X  X      X      X
5'-GTGACCTTCCGGCATCATCGGTATGATGACCTGGTGC GGACCCTGTACAAGGTGCAGAA-3'

```

Abb. 5.1.: Vergleich der Sondensequenz (unten) mit der cDNA-Sequenz (Mitte); die bekannte Aminosäuresequenz ist oben dargestellt, Fehlpaarungen sind durch ein X gekennzeichnet.

Der gefundene Klon kodiert für die vollständige cDNA der kleinen Untereinheit von Carboxypeptidase N. Der 5'-untranslatierte Bereich ist mit 213 Basenpaaren ungewöhnlich lang. Er enthält drei Stopcodons. Dadurch wird die Expression eines β -Galaktosidase-Fusionsproteins verhindert. Folglich war es auch nicht möglich, diesen Klon mit der immunologischen Nachweismethode zu isolieren. Allenfalls hätten unvollständige Klone detektiert werden können, denen diese Stopsignale fehlen. Obwohl eine statistisch ausreichende Anzahl von Klonen immunologisch gesichtet wurde, konnte ein solcher Klon nicht isoliert werden.

Der 115 Bp umfassende, 3'-untranslatierte Bereich der cDNA weist kein typisches AATAAA-Polyadenylierungssignal auf. Statt dessen findet man eine AATACA-Sequenz im gewohnten Abstand zum poly-A Schwanz. Eine ähnliche Situation ist bei Carboxypeptidase E bekannt. Hier wurden Transkripte mit unterschiedlich langen 3'-untranslatierten Bereichen beobachtet (Fricker et al., 1986). Das normale Polyadenylierungssignal wurde nur in der cDNA-Spezies gefunden, deren 3'-untranslatierter Bereich um 1,2 kB länger war als der eines kürzeren Klonen, der ein ungewöhnliches Polyadenylier-

ungssignal (AAATATAA) aufwies. Möglicherweise sind auch bei Carboxypeptidase N aufgrund unterschiedlich langer 3'-untranslatierter Bereiche mehrere mRNA-Spezies zu detektieren.

Der translatierte Bereich beginnt mit einer typischen, 20 Aminosäuren langen Signalsequenz. Die einzig mögliche Schnittstelle für die Signalpeptidase liegt, wenn auch nicht optimal den von vonHeijne (1986) beschriebenen Regeln folgend, zwischen Prolin (20) und Valin (21). Der N-Terminus stimmt so mit dem bei der Aminosäuresequenzierung ermittelten überein. Offensichtlich wird kein Proenzym gebildet. Im Gegensatz zu Carboxypeptidase E, das in einer Proform synthetisiert und als Speicherenzym in Granula gefunden wird (Fricker et al., 1986), ist Carboxypeptidase N im Blut stets in aktiver Form vorhanden. Die Aminosäuresequenzen von Carboxypeptidase E (vom Rind; Fricker et al., 1986) und der kleinen, enzymatisch aktiven Untereinheit von humaner Carboxypeptidase N sind sehr ähnlich (Abb 5.2.)

Abb 5.2.: (Seite 44) Vergleich der Aminosäuresequenzen von Carboxypeptidase N (kleine Untereinheit) und von Carboxypeptidase E.

Die an der Zinkbindung und an der enzymatischen Reaktion beteiligten Aminosäuren sind mit * gekennzeichnet, die basischen Aminosäurepaare werden durch Fettdruck hervorgehoben. Oben: Carboxypeptidase N; unten: Carboxypeptidase E.

1 MSDLLSVFLHLLLLFKLVAPVTFRHHRYDDLL
 1 R P Q E D G I S F E Y H R Y P E L

32 VRTLYKVQNECPGITRIVYSIGRSVEGRHLYV
 18 REALVSVWLQCAAVSRITYTVGRSFEGRELLLV

63 LEFSDHPGIHEPELEPEV KYVGNMHGNEALGR
 49 LELSDNPGVHEPEGGEPEFKYIGNMHGNEAVGR

94 ELM LQLSEFLCEEFRRNRNQRI VQLIQDTRI H
 80 ELLIFLAQYLCNEYQKGNETIVQLIHNTRIH

125 I L P S M N P D G Y E V A A A Q - G P N K P G Y L V G R N N A
 111 I M P S L N P D G F E K A A S Q L G E L K - D W F V G R S N A

155 N G V D L N R N F P D L N T Y I Y Y N E K Y G G P N H H L P L
 141 Q G I D L N R N F P D L D R I V Y I N E K E G G P N N H L - L

186 P D N W K S Q V - - - - - E P E T R A V I R W M H S F N F V
 171 - K N L K K I V D Q N T K L A P E T K A V I H W I M D I P F V

211 L S A N L H G G A V V A N Y P Y D K S F E H R V R G V R R T A
 201 L S A N L H G G D L V A N Y P Y D - - - E T R - S G S A H E Y

242 S T P T P D D K L F Q K L A K V Y S Y A H G W M F Q G W N - -
 228 S S - C P D D D I F Q S L A R A Y S S F N P P M S D P D R P P

271 C - - - G D - Y F P D G I T N G A S W Y S L S K G M Q D F N
 258 C R K N D D S S F V E G T T N G A A W Y S V P G G M Q D F N

297 Y L H T N C F E I T L E L S C D K F P P E E E L Q R E W L G N
 289 Y L S S N C F E I T V E L S C E K F P P E E T L K N Y W E D N

328 R E A L I Q F L E Q V H Q G I K G M V L D E N Y N N L A N A V
 320 K N S L I S Y I Q Q I H R G V K G F V R D L Q G N P I A N A T

359 I S V S G I N H D V T S G D H G D Y F R L L L P G I Y T V S A
 351 L S V E G I D H D V T S A K D G D Y W R L L V P G N Y K L T A

390 T A P G Y D P E T V T V T V G P A E P T L - V N F H L - K R S
 382 S A P G Y L A I A K K V A V - P Y S P A V R V D F E L E S F S

419 I P Q V S P V R R A P S R R H G V R A K V Q P Q A R K K E M E
 412 E R K E E E K E E L M E W W K M M S E T L N F - - - - -

450 M R Q L Q R G P A
 - - - - -

Um maximale Übereinstimmung beider Sequenzen zu erreichen, mußten sowohl bei humaner Carboxypeptidase N als auch bei boviner Carboxypeptidase E sieben, meist kleine Lücken eingefügt werden. Trotz des Speziesunterschiedes findet man enge Verwandtschaft: die Übereinstimmung beider Sequenzen beträgt etwa 49%. Bei den nicht übereinstimmenden Aminosäuren können etwa 40% als konservative Aminosäureaustausche interpretiert werden (Lücken wurden als Fehlpaarungen betrachtet). Auch bei den in Abb. 5.3. dargestellten Hydropathieprofilen von Carboxypeptidase N (kleine Untereinheit) und Carboxypeptidase E wird die Ähnlichkeit beider Proteine deutlich.

Abb. 5.3.: (Seite 46) Hydropathieprofile von Carboxypeptidase N (kleine Untereinheit) und Carboxypeptidase E.

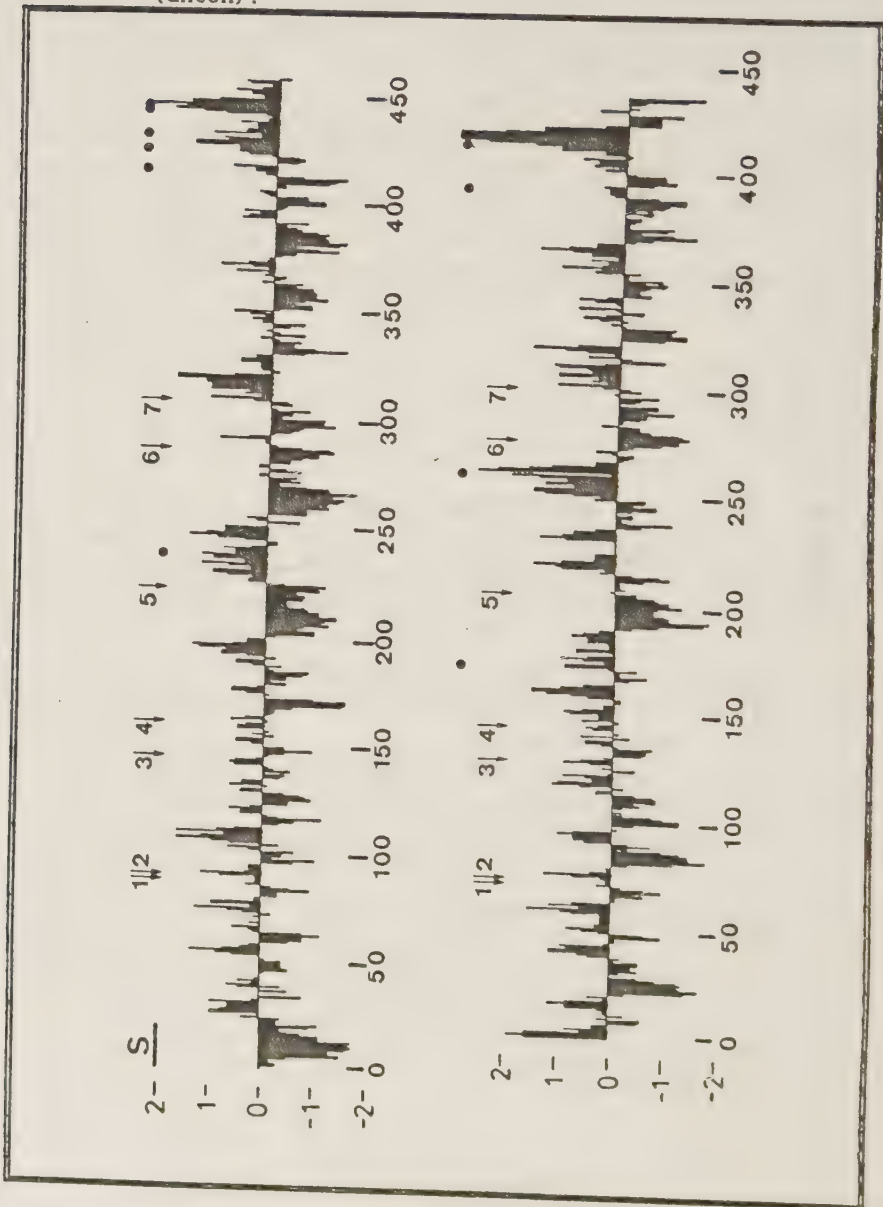
Da Carboxypeptidase E kein Signalpeptid aufweist, wurde dessen Hydropathieprofile gegenüber dem von Carboxypeptidase N entsprechend verschoben.

Abszisse: Zahl der Aminosäuren; hydrophile Bereiche haben einen positiven, hydrophobe einen negativen Hydropathie-Index.

S: Signalpeptid; •: basische Aminosäurepaare

↓: an der Zinkbindung und der enzymatischen Reaktion beteiligte Aminosäuren: 1 = His 86 (CPN) bzw. 72 (CPE); 2 = Glu 89 (CPN) bzw. 75 (CPE); 3 = Lys 144 (CPN) bzw. 131 (CPE); 4 = Arg 161 (CPN) bzw. 147 (CPE); 5 = His 216 (CPN) bzw. His 206 (CPE); 6 = Tyr 286 (CPN) bzw. 278 (CPE); 7 = Glu 308 (CPN) bzw. 300 (CPE).

Abb. 5.3.: Hydropathieprofile der kleinen Untereinheit von Carboxypeptidase N (oben) und Carboxypeptidase E (unten).



Im C-terminalen Bereich treten zwischen den Carboxypeptidasen N und E beträchtliche Unterschiede in der Aminosäuresequenz auf, Carboxypeptidase N ist außerdem um 17 Aminosäuren länger. Für beide C-terminale Bereiche wird eine hydrophile α -Helix vorhergesagt, die in Carboxypeptidase N einen stark basischen und in Carboxypeptidase E einen stark sauren Charakter aufweist. Bei Carboxypeptidase E wurde vermutet, daß dieser Bereich durch die Prozessierung an basischen Aminosäurepaaren abgespalten werden könnte, wodurch eine membrangebundene in eine lösliche Form überführt werden sollte (Fricker et al., 1986). Auch bei Carboxypeptidase N findet man am C-Terminus eine auffällige Häufung von basischen Aminosäurepaaren (Arg-Arg 236/239; Lys-Arg 416/417; Arg-Arg 426/427; Arg-Arg 431/432; Arg-Lys-Lys 444/445/446). Die bisher in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese beobachteten unterschiedlichen Molekulargewichte der kleinen Untereinheit von Carboxypeptidase N ließen sich durch eine Prozessierung an diesen Stellen erklären. Das aus der cDNA berechnete Molekulargewicht liegt bei 50.000. Die bisher veröffentlichten Molekulargewichte liegen zwischen 42.000 und 55.000 (Oshima et al., 1974 und 1975, Plummer & Hurwitz, 1978 und Levin et al., 1982). Das stimmt mit bei uns beobachteten Molekulargewichtswerten von 50.000, 46.000 und 43.000 überein; die an basischen Aminosäurepaaren proteolytisch prozessierten Proteine hatten Molekulargewichte von etwa 46.100, 46.000, 44.500, 44.000 und 43.000. Über die Funktion dieses C-terminalen Bereiches kann nur spekuliert werden; eventuell ist er an der Komplexbildung mit der großen Untereinheit beteiligt.

Beim Vergleich der Hydropathieprofile fallen weitere Unterschiede zwischen Beiden Enzymen auf. Am Aminoende ist Carboxypeptidase E um sechs Aminosäuren länger als Carboxypeptidase N, hat aber kein Signalpeptid. Der dem hydrophoben Abschnitt von Aminosäure 20 bis 30 von Carboxypeptidase E entsprechende Bereich bei Carboxypeptidase N (Aminosäure 30-39) hat eher hydrophilen Charakter. Umgekehrt ist es bei zwei anderen Bereichen: Carboxypeptidase N (Aminosäure 153 bis 174 und 250 bis 270) ist an diesen Stellen sehr hydrophil, Carboxypeptidase E (Aminosäure 163 bis 180

und 250 bis 270) dagegen sehr hydrophob. Der letzte dieser Abschnitts (Aminosäure 250 bis 270), der bei den Carboxypeptidasen A und B gänzlich fehlt, liegt nahe beim aktiven Zentrum (zum Vergleich von Carboxypeptidase A, B und E siehe Fricker et al., 1986).

Weiterhin ist auffallend, daß sich Carboxypeptidase N und Carboxypeptidase E in der Anzahl der Cysteine unterscheiden. In Carboxypeptidase N sind nur fünf Cysteine zu finden, das sechste (Cystein 230 in Carboxypeptidase E) fehlt. Welche strukturellen oder funktionellen Folgen dieser Unterschied hat, kann hier nicht festgestellt werden.

Die für die katalytische Funktion der intensiv untersuchten Carboxypeptidase A essentiellen Aminosäuren sind auch in Carboxypeptidase N konserviert (zum enzymatischen Mechanismus von Carboxypeptidase A siehe Christianson et al., 1987). Den für die Zinkbindung notwendigen Aminosäuren His 69, Glu 89 und His 196 von Carboxypeptidase A entsprechen die Aminosäuren His 86, Glu 89 und His 216 in Carboxypeptidase N. Die an der enzymatischen Reaktion beteiligten Aminosäuren Tyr 286 und Glu 300 entsprechen Tyr 248 und Glu 270 in Carboxypeptidase A. Ob die Aufgabe von Arg 127 (Carboxypeptidase A) von einem Lysin (Lys 131 in Carboxypeptidase E und Lys 144 in Carboxypeptidase N) übernommen wird, ist unklar. Andere Aminosäuren, deren Funktion in Carboxypeptidase A diskutiert wird (Ser 197 und Tyr 198), können in Carboxypeptidase N nicht lokalisiert werden. Von den für die Substratbindung verantwortlichen Aminosäuren ist nur das konservierte Arg 161 (Arg 145 bei Carboxypeptidase A) zu finden. Dieses Arginin bildet zu der endständigen Carboxylgruppe des Substrates eine Wasserstoffbrückenbindung aus; die anderen für die Substratbindung nötigen Aminosäuren sind wohl wegen der unterschiedlichen Substratspezifität nicht konserviert. In den Hydropathieprofilen sind die Bereiche um die genannten Aminosäuren von Carboxypeptidase E und N nahezu identisch. Das folgende Schema zeigt im Vergleich wichtige Aminosäuren von Carboxypeptidase A, E und N:

CPA Rind	CPE Rind	CPN Mensch	Funktion
His 69 Glu 72 His 196	His 72 Glu 75 His 206	His 86 Glu 89 His 216	Zinkbindung
Arg 145	Arg 147	Arg 161	Bindung der C-terminalen Carboxylgruppe
Arg 127 Tyr 248 Glu 270	Lys 131? Tyr 278 Glu 300	Lys 144? Tyr 286 Glu 308	Bei der enzymatischen Reaktion beteiligte Aminosäuren

Auf Grund der großen Ähnlichkeit von Carboxypeptidase E (Enkephalin-Konvertase) und Carboxypeptidase N ist es nicht verwunderlich, daß auch in ihren Aufgaben Gemeinsamkeiten entdeckt wurden. So wurde beobachtet, daß Hexapeptid-Enkephaline, die ein C-terminales Arginin oder Lysin enthalten, wesentlich bessere Substrate für Carboxypeptidase N darstellen als Kinine oder Anaphylatoxine (Skidgel et al., 1984). Carboxypeptidase N könnte im Blut, neben ebenfalls zirkulierenden Amino-peptidasen, den Spiegel dieser Opioidhormone regulieren. Unter Umständen spielt Carboxypeptidase N bei der Prozessierung dieser Peptidhormone eine viel größere Rolle als bisher angenommen wurde.

Da bisher beim Mensch keine Carboxypeptidase E und beim Rind keine Carboxypeptidase N beschrieben wurde, stellt sich aufgrund der großen Ähnlichkeit beider Proteine die Frage, ob es sich nicht nur um spezies-spezifische Sequenzunterschiede des gleichen Enzyms handelt. Die kleine Untereinheit bildet zwar im Blut einen Komplex mit der großen Untereinheit, wodurch vermutlich die Stabilität erhöht wird, in anderer Umgebung könnten jedoch andere Faktoren diese Aufgabe übernehmen. Dadurch könnte zum Beispiel immer eine optimale Feinanpassung der Funktion an die jeweiligen Erfordernisse erreicht werden (z. B. unterschiedliche pH-Optima).

Strukturelle Unterschiede innerhalb der Familie der Carboxypeptidasen könnten sich aufgrund unterschiedlicher Aufgaben entwickelt haben. Vermutlich stammen beide Gruppen von Carboxypeptidasen, Carboxypeptidase N und E auf der einen Seite und die pankreatischen Verdauungsenzyme (Carboxypeptidase A und B) auf der anderen Seite, von einer gemeinsamen Vorläuferform ab.

Zusätzlich zur Aufklärung der Primärstruktur der kleinen Unter-
einheit der Carboxypeptidase N mit ersten Hinweisen auf Wirkungs-
mechanismus und Stellung innerhalb der Familie der Carboxypepti-
dasen wird der Zugang zu rekombinantem Protein und damit zu
weiteren Studien zur regulatorischen Funktion des Enzyms "in vivo"
eröffnet.

6. LITERATUR

- Beaucage, S. L. & Caruthers, M. H. (1981)
Deoxynucleoside phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis
Tetrahedron Lett. 22, 1859-1862
- Belew, M., Gerdin, B., Lindeberg, G., Porath, J., Saldeen, T. & Wallin, R. (1980)
Structure-activity relationships of vasoactive peptides derived from fibrin or fibrinogen degraded by plasmin
Biochim. Biophys. Acta 621, 169-178
- Benton, W. D. & Davis, R. W. (1977)
Screening Lambda gt recombinant clones by hybridization in situ
Science 196, 180-182
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979)
Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA
Nucl. Acid Res. 7, 1513-1523
- Bokisch, V. A. & Müller-Eberhard, H. J. (1970)
Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase
J. Clin. Invest. 49, 2427-2436
- Chen, E. J. & Seeburg, P. H. (1985)
Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA
DNA 4, 165-170
- Christianson, D. W., David, P. R. & Lipscomb, W. N. (1987)
Mechanism of Carboxypeptidase A: Hydration of a ketonic substrate analogue
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1512-1515

Erdős, E. G. & Sloane, E. M. (1962)

An enzyme in human blood plasma that inactivates bradykinin and kallidins

Biochem. Pharmacol. 11, 585-592

Erdős, E. G., Wohler, I. M., Levine, M. I. & Westerman, M. P. (1965)

Carboxypeptidase in blood and other fluids. Values in human blood in normal and pathological conditions

Clin. Chim. Acta 11, 39-43

Feinberg, A. & Vogelstein, B. (1983)

A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity

Anal. Biochem. 132, 6-13

Feinberg, A. & Vogelstein, B. (1984)

A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity (Addendum)

Anal. Biochem. 137, 266-267

Folk, J. E., Piez, K. A., Carroll, W. R. & Gladner, J. A. (1960)

Carboxypeptidase B. Purification and characterization of the porcine enzyme

J. Biol. Chem. 235, 2272-2277

Fricker, L. D. & Snyder, S. H. (1983)

Purification and characterization of enkephalin convertase, an enkephalin-synthesizing carboxypeptidase

J. Biol. Chem. 258, 10950-10955

Fricker, L. D., Evans C. J., Esch F. S., Herbert, E. (1986)

Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine carboxypeptidase E

Nature 323, 461-464

Graham, A., Steven, J., McKechnie, D. & Harris, W. J. (1986)
Direct DNA sequencing using AMV and M-MLV reverse transcriptase
BRL Focus 8, Nr. 2

Guidelines for quick and simple plasmid sequencing (1986)
Handbuch von Boehringer Mannheim; verfaßt von Peter Heinrich.

Henikoff S. (1984)
Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted
breakpoints for DNA sequencing
Gene 28, 351-359

Ivanov, I. & Gigova, L. (1985)
Isolation of lambda phage DNA by hydroxylapatite chromatography
Anal. Biochem. 146, 389-392

Kwok, S. C. M., Ledley, F. D., DiLella, A. G., Robson, K. J. H. &
Woo, S. L. C. (1985)
Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and
amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase
Biochemistry 24, 556-561

Laemmli, U. K. (1970)
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of
bacteriophage T4
Nature 227, 680-685

Lathe R. (1985)
Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence
data. Theoretical and practical considerations.
J. Mol. Biol. 183, 1-12

Levin, Y., Skidgel, R. A. & Erdös, E. G. (1982)
Isolation and characterisation of the subunits of human plasma
carboxypeptidase N (kininase I)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4618-4622

- Lipperheide, C & Otto, K. (1986)
Improved purification and some properties of bovine lysosomal carboxypeptidase B
Biochim. Biophys. Acta 880, 171-178
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982)
Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Moeremans, M., Daneels, G. & De Mey, J. (1985)
Sensitive colloidal metal (gold or silver) staining of protein blots on nitrocellulose membranes
Anal. Biochem. 145, 315-321
- Oshima, G., Kato, J. & Erdős, E. G. (1974)
Subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase I; anaphylatoxin inactivator)
Biochim. Biophys. Acta 365, 344-348
- Oshima, G., Kato, J., & Erdős, E. G. (1975)
Plasma carboxypeptidase N, subunits and characteristics
Arch. Biochem. Biophys. 170, 132-138
- Otter, T., King, S. M. & Witman, G. B. (1987)
A two-step procedure for efficient electrotransfer of both high molecular weight (>400.000) and low molecular weight (<20.000) proteins
Anal. Biochem. 162, 370-377
- Plummer, T. H. & Hurwitz, M. Y. (1978)
Human plasma Carboxypeptidase N
J. Biol. Chem. 253, 3907-3912

- Quioco, F. A. & Lipscomb, W. N. (1971)
Carboxypeptidase A: a protein and an enzyme
Advan. Protein Chem. 25, 1-78
- Richardson, C. C. (1968)
Polynucleotide kinase from *Escherichia coli* infected with
bacteriophage T4
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 158
- Rother, U. & K., (1984)
in "Pathobiochemie der Entzündung" (Lang, H. & Greiling, H., ed.)
pp. 26-37, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
- Rybák, M., Mansfeld, V., Grimová, J. & Petáková, M. (1978)
Effect of carboxypeptidase N, aprotinin and anti-inflammatory
drugs of pyrazolidine type on experimental inflammations in rats
Pharmacology 16, 11-16
- Sanger, J. P., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467
- Saul, A. & Yeganeh, F. (1986)
Electrophoretic identification of fusion proteins expressed in
single recombinant lambda bacteriophage plaques
Anal. Biochem. 156, 354-356
- Simpson, R. J., Moritz, R. L., Nice, E. E. & Grego, B. (1987)
A high-performance liquid chromatography procedure for recovery
subnanomole amounts of protein from SDS-gel electroeluates for
gas-phase sequence analysis
Eur. J. Biochem. 165, 21-29
- Skidgel, R. A., Johnson, A. R. & Erdős, E. G. (1984a)
Hydrolysis of opioid hexapeptides by carboxypeptidase N. Presence
of carboxypeptidase in cell membranes
Biochem. Pharmacol. 33, 3471-3478

- Skidgel, R. A., Davis, R. M. & Erdös, E. G. (1984b)
Purification of a human urinary carboxypeptidase (kininase)
distinct from Carboxypeptidase A, B or N
Anal. Biochem. 140, 520-531
- Skidgel, R. A. & Erdös, E. G. (1984) in Bergmeyer, H. U. (ed.),
Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed., Verlag Chemie, Weinheim.
Vol. V. Seite 60-72
- Southern, E. M. (1975)
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by
gel electrophoresis
J. Mol. Biol. 98, 503-517
- Takagaki Y., Kitamura N. & Nakanishi S. (1985)
Cloning and sequence analysis of cDNAs for human high molecular
weight and low molecular weight prekininogens
J. Biol. Chem. 260, 8601-8609
- von Heijne G. (1986)
A new method for predicting signal sequence cleavage sites
Nucl. Acid Res. 14, 4683-4690
- Weiss B., Jacquemin-Salbon A., Live T. R., Fareed G. D. &
Richardson C. C. (1968)
Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid
J. Biol. Chem. 243, 4543-4555
- Young, R. A. & Davis, R. W. (1983)
Efficient isolation of genes by using antibody probes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1194-1198

7. ABKURZUNGEN

Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CP	Carboxypeptidase
CPA	Carboxypeptidase A
CPB	Carboxypeptidase B
CPE	Carboxypeptidase E
CPN	Carboxypeptidase N
ddATP	2'3'-Didesoxyadenosin-5'-triphosphat
ddCTP	2'3'-Didesoxycytidin-5'-triphosphat
ddGTP	2'3'-Didesoxyguanosin-5'-triphosphat
ddTTP	2'3'-Didesoxythymidin-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC	Enkephalin Convertase
H-Kininogen	hochmolekulares Kininogen
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thio- galaktopyranosid
kB	"Kilobasen", 1.000 Basen
MCS	Multiple Klonierungsstelle
pfu	plaque forming units
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Matthias Schube
Wohnort	Tegernsee
Geburtsdatum	20.10.1953
Eltern	Wolfgang Schube Susanne Schube geb. Ulrich
Familienstand	verheiratet, zwei Kinder

Ausbildung

1960 - 1964	Besuch der Volksschule
1964 - 1973	Besuch des Gymnasiums
1973	Abitur am Gymnasium Tegernsee
1974 - 1979	Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
1979 - 1980	Praktikum am Max-Planck-Institut für Biochemie Martinsried
1980 - 1981	Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
1981	Diplom-Hauptprüfung
1982	Diplomarbeit am Institut für physikalische Biochemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Juli 1983 - Oktober 1987	Dissertationsarbeit an der Abteilung für Klin. Chemie und Klin. Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München (Vorstand Prof. Dr. H. Fritz)

